VISIT…

LANZAROTE

Caliente.COM

THE TRANSFORMED CELL

Edited by

IVAN L. KAMERON,
THOMAS B. POOL

Department of Anatomy
The University of Texas Health Science Center
at San Antonio
San Antonio, Texas

1981
ACADEMIC PRESS
NEW YORK LONDON TORONTO SYDNEY SAN FRANCISCO

ТРАНСФОРМИРОВАННАЯ КЛЕТКА

Под общей редакцией
ИВАНА Л. КАМЕРОНА,
ТОМАСА Б. ПУЛА

Перевод с английского
В. И. СТРУКА,
Е. А. БАГЛЕЯ,
С. А. ПАЩЕНКО

под редакцией
члена-корреспондента АН УССР
З. А. БУТЕНКО

КИЕВ
НАУКОВА ДУМКА
1985

УДК 576.385.5

Трансформированная клетка / Эш Б. Б., Билл П. Т., Камерон И. Л. и др.; Под общ. ред. Камерона И. Л., Пула Т. Б.; Пер. с англ. под ред. Бутенко З. А.— Киев: Наук. думка, 1985.— 384 с.

В монографии освещены актуальные вопросы клеточной биологии. Представлены современные концепции и достижения, касающиеся различных аспектов характеристики нормальных и опухолевых клеток. Для разработки новых подходов избирательного воздействия на злокачественно трансформированные клетки приведен сравнительный анализ данных регуляции размножения и клеточного метаболизма в условиях организма и культуры ткани.

Для онкологов, цитологов, биохимиков и биофизиков.

Авторы

Б. Б. Эш, П. Т. Билл, И. Л. Камерон, С. Дж. Фридман, Ю. У. Гернер, Р. Дж. Джиллиз, К. Хэзлвуд, А. К. Кейт, Б. Е. Магун, А. М. Мастро, Д. Медина, М. П. Мойер, Р. С. Мойер, Т. Б. Пул, К. Н. Прасад, П. Н. Рао, Ф. Скехан, Н. К. Р. Смит, Р. Л. Спаркс, П. С. Сункара, Л. Д. Томеи, Ч. Е. Уэннер

Редакция физиологической, биохимической и медицинской литературы

К $\frac{4116000000-531}{М221(04)-85}$ 465-85

Copyright ©, by Academic Press, Inc.
©Перевод на русский, издательство «Наукова думка», 1985

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Настоящая книга относится к серии монографий авторитетных зарубежных публикаций, периодически освещающих актуальные вопросы клеточной биологии. Посвящена она важнейшей проблеме современности — выяснению природы и отличительных свойств злокачественно трансформированной клетки. Книга написана крупными специалистами в области патологии, онкологии, биохимии, молекулярной биологии под редакцией известных ученых научного центра здоровья Техасского университета — Ивана Л. Камерона и Томаса Б. Пула.

Привлекает внимание то, что, исходя из представления о важности существующих фундаментальных знаний по биологии клетки для решения главнейших вопросов онкологии, в книге обобщены новейшие сведения, касающиеся различных аспектов характеристики нормальных и опухолевых клеток.

Особая ценность книги заключается в том, что в ней уделено большое внимание критическому изложению имеющихся многочисленных экспериментальных данных в сравнительном плане. Этот путь позволяет более глубоко проанализировать различия, существующие между нормальными и опухолевыми клетками, и избежать возможные ошибки трактовки результатов при проведении исследований механизма канцерогенеза на разных моделях и клеточных системах. Избранный подход способствует созданию новых теорий о природе опухолевой клетки и разработке более эффективных подходов избирательного ингибирующего воздействия на злокачественный рост.

Безусловно, полезными и интересными являются основные концепции и онкологические термины, которые рассматриваются в начале книги ее редакторами, в частности, раковая клетка — это клетка, утратившая нормальный контроль регуляции роста, что согласуется с современными представлениями. Справедливым следует считать утверждение авторов о том, что дальнейшие интенсивные поиски отличительных свойств злокачественных и соответствующих нормальных клеток позволяют углубить наши знания в области биологии клетки и будут способствовать более эффективному контролю над опухолевым ростом.

Вместе с тем нельзя не отметить и имеющиеся в книге дискуссионные положения, например, о происхождении опухолевых клеток из различных видов дифференцированных клеток, о структуре и функции клеточных мембран, о классификации ДНК- и РНК-содержащих опухолеродных вирусов, о механизмах изменения аденилатциклазной активности трансформированных клеток, а также о недостатках, связанных с бурным накоплением новых фактов, в частности, в связи с открытием и изучением онкогенов. Этим можно объяснить упущения в главе 6, где не нашла отражение современная трактовка механизма злокачественной трансформации клеток при воздействии онкогенных вирусов. Компенсировать это читатели могут, ознакомившись с материалами дискуссии, посвященной онкогенам и канцерогенезу, опубликованными в 1984 г. в журналах «Вопросы онкологии», Вестнике АН СССР, «Экспериментальная онкология» и с другими работами. К сожалению, в этой зарубежной монографии, как и в некоторых других, недостаточно цитируются работы советских онкологов.

В целом же перевод настоящей книги на русский язык, осуществленный известными специалистами в области экспериментальной онкологии д-ром мед. наук В. И. Струком (главы 2, 4, 6, 7), д-ром мед. наук Е. А. Баглеем (главы 3, 9, 10, 12), канд. мед. наук С. А. Пащенко (главы 1, 5, 8, 11), будет полезным для научной общественности страны и привлечет внимание не только специалистов-онкологов, но и многих других исследователей, интересующихся проблемой биологии и патологии клетки.

Член-корреспондент АН УССР *З. А. Бутенко*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эта книга была задумана как серия статей, в которых описываются и оцениваются многочисленные различия, существующие между нормальными и раковыми клетками. Наша цель — сопоставить в одном источнике сравнимые данные, чтобы показать различия, обнаруженные в последние годы в результате использования разных экспериментальных подходов и методических приемов. Авторам было предложено полученные в их области исследований данные суммировать и оценить критически в свете значимости для понимания клеточной биологии рака. Такой подход приблизит читателя к современным теориям, касающимся различий между трансформированными клетками и их нормальными аналогами.

Глава 1 включает краткое описание терминологии и основных концепций, рассматриваемых в книге, и предназначена специально для тех читателей, чья область исследований прямо не связана с биологией раковой клетки или онкологией. Главы 2 и 3 могут служить как полезный обосновывающий материал для понимания, так как в них анализируются доказательства «за» и «против» возможной корреляции туморогенности in vivo с изменениями in vitro системы цитоскелета, субстратнозависимого роста, продукции активатора плазминогена, агглютинабельности лектинов, свойств клеточной поверхности и плазматических мембран. В следующих двух главах сравниваются общие аспекты регуляции клеточной пролиферации и взаимоотношений между перемещением ионов и энергетическим метаболизмом в нормальных и трансформированных клетках. Такой важный раздел, как трансформация нормальных клеток путем инфицирования новым генетическим материалом онкогенных вирусов, рассматривается в специальной главе.

Последние шесть глав посвящены отдельным клеточным свойствам и нацелены на демонстрацию различий, существующих между нормальными и трансформированными клетками. Обсуждено значение циклических нуклеотидов, метаболизма полиаминов, мобильности клеточной воды, вязкости клеток, внутриклеточного pH и концентрации отдельных элементов. В трех из этих шести глав обсуждаются свойства, которым уделялось мало внимания в последние годы, и поэтому они содержат новую информацию и новые подходы в изучении клеточной биологии рака.

Так как различия нормальных и опухолевых клеток детально рассмотрены и критически проанализированы, они могут быть отправным пунктом при разработке селективных терапевтических воздействий на опухоль.

Эта книга будет стимулировать развитие новых направлений оценки нормальных и опухолевых клеток и способствовать появлению новых и уникальных подходов к изучению клеточной биологии рака и противораковой терапии.

Ясно, что недостаточность наших фундаментальных знаний о клетке остается большим препятствием в создании эффективной противораковой терапии. Мы убеждены, что непрекращающиеся поиски отличительных свойств опухолевых и соответствующих нормальных клеток смогут привести к фундаментальным достижениям в знаниях об этих клетках, контроле и лечении рака.

Иван Л. Камерон
Томас Б. Пул

1

ТРАНСФОРМИРОВАННАЯ КЛЕТКА: НЕКОТОРЫЕ ВВОДНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Иван Л. Камерон и Томас Б. Пул

1.1. Основные понятия, терминология и концепции 7
1.2. Туморогенность и клеточная трансформация 9
1.3. Указатель литературы 11

1.1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ, ТЕРМИНОЛОГИЯ И КОНЦЕПЦИИ

Раковая клетка может быть охарактеризована как клетка, утратившая контроль за размножением и расположением; таким образом, она выходит из-под регуляторного влияния тех факторов, на которые реагируют нормальные клетки. Начало раковым клеткам могут давать разные типы клеток дифференцированных тканей в результате процесса клеточной трансформации. В большинстве случаев трансформированные клетки сохраняют некоторые свойства клеток исходной нормальной ткани и это является основанием для идентификации и классификации опухолевых клеток. Отдельные формы рака часто существенно различаются, в связи с чем можно сказать, что понятие «рак» включает разнообразные по своему проявлению заболевания.

Мы позволим себе дать краткий обзор некоторых свойств опухолевых клеток in vivo, а также рассмотрим некоторые свойства трансформированных клеток in vitro, общие сведения по этому вопросу содержатся в работах (Hynes, 1979; Smets, 1980; Watson, 1976).

Многие популяции нормальных клеток в организме активно пролиферируют, а их размножение тщательно контролируется определенным балансом процессов образования и гибели клеток. Опухолевая клетка ускользает от этого контроля, в результате чего развивается опухоль, или неоплазма. Некоторые типы опухолевых клеток пролиферируют быстро, другие — медленно, но в любом случае темп размножения опухолевых клеток превышает темп их гибели. Таким образом, общим свойством опухолевых клеток является нарушение регуляции их роста.

Нарушение регуляции размножения само по себе во многих случаях приводит к развитию доброкачественной опухоли, которая мо-

жет быть удалена хирургическим путем. Однако опухолевые клетки могут проявлять свойство, называемое злокачественностью, характеризующееся изменением межклеточных связей в опухоли. Поэтому опухолевые клетки легко отделяются друг от друга или от мест прикрепления к субстрату и мигрируют. Сочетание этих свойств дает опухолевой клетке возможность инвазировать нормальные ткани и в некоторых случаях — разрушать их. При определенных условиях опухолевые клетки могут метастазировать, поскольку способны поступать в циркуляторную систему и сохранять в ней жизнеспособность, а также оседать в капиллярах отдаленных органов, где они готовы к дальнейшей инвазии, вдали от основного очага.

Наконец, опухолевые клетки in vivo в некоторых случаях антигенны. В тех случаях, когда опухолевая клетка антигенна для хозяина, она может избегать или блокировать систему иммунного надзора хозяина (Hynes, 1979).

Если кусочки нормальной ткани диссоциировать и поместить в соответствующие для культур ткани условия, то клетки растут как первичные и при пассаже могут давать начало вторичным клеткам. Такие клетки в зависимости от вида и возраста животного пассируются ограниченное число раз: до тех пор, пока становятся не способными к дальнейшей пролиферации. В некоторых случаях небольшая часть потомства вторичных клеток приобретает способность к пролиферации. Такие клетки образуют клеточную линию. Когда кусочки опухоли культивируются в таких же условиях, как и нормальные клетки, опухолевые клетки безгранично растут. Таким образом, нормальные и опухолевые клетки имеют различные свойства при росте in vitro.

Короче говоря, трансформированные или опухолевые клетки при росте in vitro имеют следующие свойства: многослойный рост, утрату контактного торможения роста, вследствие чего достигается высокая плотность роста, снижение потребности к сывороточным факторам роста, безграничную пролиферацию, низкую способность распространяться или ориентироваться на субстрате, сниженное контактное торможение движения, нарушение клеточной поверхности, в частности ее антигенных свойств и продукции протеолитических ферментов.

Исследователи, изучающие свойства нормальных и опухолевых клеток in vitro, исходят из предположения, что их наблюдения коррелируют со свойствами опухолевых клеток in vivo. Легко увидеть, что нарушение регуляции размножения является общим для опухолевых клеток, растущих in vitro и in vivo, но несколько труднее выяснить, каким образом свойства опухолевых клеток in vitro связаны с инвазивным ростом и метастазированием in vivo. Известно, что многие клетки, трансформированные in vitro, при переносе в организм соответствующего хозяина формируют опухоли, но при этом клетки часто оказываются способными к инвазивному росту или метастазированию.

В связи с возможностью получения относительно гомогенных клеточных популяций многие исследователи избрали объектом своих

исследований трансформанты нормальных клеток in vitro. В этом плане к излюбленным «нормальным» клеточным линиям относятся мышиные клетки 3Т3, происходящие из эндотелиальных клеток и имеющие морфологию культивируемых фибробластов, а также клетки почек сирийского хомячка (ВНК 21), представляющие собой фибробласты. Еще один излюбленный объект для изучения — культуры эмбриональных клеток цыплят, трансформированные вирусом саркомы Рауса (RSV) (гл. 6). Хотя клетки грызунов 3Т3 и клетки ВНК не являются истинно нормальными (т. е. они способны к бесконечной пролиферации и имеют другие свойства опухолевых клеток), они служат источником клеток, готовых к приобретению других свойств опухолевых клеток при инфекции опухолеродным вирусом, применении химического канцерогена или радиации.

1.2. ТУМОРОГЕННОСТЬ И КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

В главе 2 этой книги обсуждаются критерии, характеризующие трансформированную клетку. Наиболее адекватным критерием трансформированности клетки в культуре является ее способность формировать опухоль при трансплантации сингенному хозяину или животному с подавленной иммунной системой, такому, как бестимусные nude-мыши. Но даже несмотря на то что туморогенные свойства расцениваются как наиболее достоверный признак клеточной трансформации, тест опухолеобразования имеет недостатки. Например, на практике животному обычно вводится большое число тестируемых клеток, и, если в результате развивается опухоль, можно считать, что, по крайней мере, одна из инокулированных клеток была трансформирована с приобретением свойства опухолеобразования. Отсутствие развития опухолей после трансплантации клеток может быть связано не с отсутствием трансформированных или опухолеобразующих клеток во вводимой взвеси, а со способностью реципиента развивать достаточно иммунный ответ или с неадекватностью пути или способа введения клеток для обеспечения возможности роста трансформированных клеток (Giovanella et al., 1979; Kiessling et al., 1976). Можно получить опухолевый рост даже при использовании клеток, в норме не имеющих опухолеобразующих свойств, при помещении их в специальные условия (Boone et al., 1979). В любом случае целесообразно культивировать кусочек растущей опухоли и сравнивать свойства эксплантированных клеток со свойствами исходных клеток, поддерживаемых в культуре.

В большинстве глав этой книги критически анализируются основные различия между нормальными и трансформированными клетками. В общем эти различия сводятся к изменениям клеточной поверхности (гл. 3), циклических нуклеотидов (гл. 7), обмена полиаминов (гл. 4 и 8), состояния воды (гл. 9), вязкости (гл. 10), pH (гл. 11), содержания микроэлементов (гл. 12), регуляции роста (гл. 4), способности клеток к безграничному росту и утрате контактного торможения (Hynes, 1979; Smets, 1980; Watson, 1976) (см. также гл. 2), субстратной зависимости (за исключением лимфогемопоэтических

Примеры независимого приобретения свойств трансформированными клетками[1]

Тип клеток	Свойство	Опухолеобразование у бестимусных мышей	Источник
3T3	Бесконечная пролиферация	Неопухолеобразующие	Smets et al. (1976)
SV-3T3	Утрата контактного торможения	Слабо опухолеобразующие	
Химически трансформированные эмбриональные клетки	Субстратная зависимость (рост в мягком агаре)	Неопухолеобразующие	Freedman, Shin (1977)
Трансформированные вирусом полиомы	Утрата контактного торможения, рост в мягком агаре, специфические изменения мембранных гликопептидов	Высоко опухолеобразующие (трансплантабельные)	Glick et al. (1974)

[1]По Smets, 1980.

клеток), изменениям цитоскелета (гл. 2), энергетического обмена и мембранного транспорта (гл. 5).

Вероятно, истинно трансформированная клетка должна отличаться от нормальной по большинству, если не по всем указанным признакам, и иметь высокую опухолеобразующую способность при трансплантации. Smets (1980) представил данные в поддержку концепции, что бесконечно размножающиеся клетки могут приобретать некоторые из свойств, характерных для трансформированных клеток, независимо (Smets, 1980). Все это предполагает, что клеточная трансформация не является одноступенчатым событием. Хотя все еще ведется дискуссия, может ли клеточная трансформация быть обусловлена одноступенчатым механизмом (Langman, 1980), данные, представленные в таблице, достаточно хорошо иллюстрируют возможность независимого приобретения признаков клеточной трансформации. Число ступеней, или событий, вовлеченных в процесс клеточной трансформации, зависит, по-видимому, от типа клеток, которые трансформируются до состояния туморогенности. Например, химическая трансформация нормальной клетки с ограниченным периодом жизни должна включать много ступеней, пока у нее полностью не проявится способность к опухолеобразованию, в то время как трансформация бесконечно размножающихся клеток 3T3 до стадии утраты контактного торможения будет включать меньшее число ступеней.

В общем, в отличие от клеток человеческого происхождения клетки грызунов легко трансформируются либо спонтанно, либо при обработке канцерогенными веществами или онкогенными вирусами (Ponten, 1976) (см. гл. 6). Действительно, Ponten (1976) расценивает мышиные клетки как генетически нестабильные и, таким образом, представляющие малоподходящую модель для изучения многоступенчатого процесса клеточной трансформации.

Опухолевая клетка in vivo, по-видимому, находится на последней ступени общего ряда ступеней, ведущих к ускользанию клетки от контроля за размножением, которому подвержены нормальные клетки исходной ткани. Само собой разумеется, что культивируемые трансформированные клетки не сталкиваются с таким множеством ограничений роста, как опухолевые клетки, растущие in vivo.

Исследования in vitro дают прекрасную возможность для выяснения молекулярных механизмов клеточной трансформации. Однако трансплантация в организм культивируемых трансформированных клеток не подходит для изучения инвазионного роста опухоли и метастазирования — свойств, коррелирующих со злокачественностью. Культуры трансформированных клеток также не считаются подходящими моделями для изучения взаимодействия иммунной системы хозяина с опухолевыми клетками.

Мы надеемся, что материалы глав этой монографии помогут выяснить механизмы, играющие роль в процессе клеточной трансформации, а также механизмы, действующие в трансформированных клетках. Только путем выяснения этих механизмов можно надеяться на преодоление разрыва между исследованиями in vitro и пониманием патогенеза опухолевого роста in vivo.

1.3. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boone C. W., Vembu D., White B. J., Takeichi N., Paranjpe M.* (1979). Karyotypic, antigenic, and kidney-invasive properties of cell lines from fibroscarcomas arising in C3H/10T 1/2 cells implanted subcutaneously attahced to plastic plates. Cancer Res., 39, 2172—2179.
2. *Freedman V., Shin S.* (1977). Isolation of human diploid cell variants with enhanced semisolid medium after a single-step chemical mutagenesis. J. Natl. Cancer Inst., 58, 1873—1875.
3. *Giovanella B., Nilsson K., Zech L., Yim O., Klein G., Stehlin J. S.* (1979). Growth of diploid, Epstein—Barr virus—carrying human lymphoblastoid cell lines heterotransplanted into nude mice under immunologically privileged conditions. Int. J. Cancer 24, 103—113.
4. *Glick M. C., Rabinowintz Z., Sachs L.* (1974). Surface membrane glycopeptides which coincide with virus transformation and tumorigenesis. J. Virol. 13, 967—974.
5. *Hynes R. O.*, ed. (1979). «Surfaces of Normal and Malignant Cells.» Wiley, New York.
6. *Kiessling R., Petrany G., Klein G., Wigzell H.* (1976). Non-T-cell resistance against a mouse moloney lymphoma. Int. J. Cancer 17, 275—281.
7. *Langman R. E.* (1980). Transformation and tumorigenesis. Nature (London) 283, 246—248.
8. *Ponten J.* (1976). The relationship between in vitro transformation and tumor formation in vivo. Biochim. Biophys. Acta 458, 397—422.
9. *Smets L. A.* (1980). Cell transformation as a model for tumor induction and neoplastic growth. Biochim. Biophys. Acta 605, 93—111.
10. *Smets L. A., van Beek W. P., van Rooy H.* (1976). Surface glycoproteins and concanovalin-A-mediated agglutinability of clonal variants and tumor cells derived from SV40-virus-transformed mouse. 3T3 cells. Int. J. Cancer 18, 462—468.
11. *Watson J. D.* (1976). «Molecular Biology of the Gene». Benjamin, New York.

2

ЗЛОКАЧЕСТВЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ: КОРРЕЛЯЦИИ МЕТОДОВ IN VIVO И IN VITRO

Филип Скехан и Сюзен Дж. Фридман

2.1. Введение 12
2.1.1. Важность корреляции in vivo 13
2.1.2. Нестабильность фенотипа и видообразование 14
2.1.3. Состав опухоли 15
2.1.4. Эффективность трансформации 16
2.2. Пробы на онкогенность in vivo 16
2.2.1. Изогенные трансплантаты 17
2.2.2. Иммунологически привилегированные места 18
2.2.3. Иммунодефицитные хозяева 19
2.2.4. Иммуносупрессированные хозяева 20
2.2.5. Приготовление клеток и путь инокуляции 20
2.2.6. Прогрессивный рост нормальных клеточных трансплантатов . . . 22
2.3. Клеточная морфология 24
2.3.1. Цитологические корреляты 24
2.3.2. Цитоскелет 25
2.3.3. Резюме 27
2.4. Зависимость от субстрата 27
2.4.1. Предпосылка 27
2.4.2. Корреляция колониеобразующей активности с туморогенностью 28
2.4.3. Зависимость от субстрата при циркулирующих метастазах . . . 32
2.4.4. Методологические трудности 34
2.4.5. Резюме 39
2.5. Агглютинабельность конканавалином А (КонА) 40
2.5.1. Предпосылка 40
2.5.2. Корреляция с туморогенностью 41
2.5.3. Методологические трудности 43
2.5.4. Резюме 46
2.6. Активатор плазминогена 47
2.6.1. Предпосылка 47
2.6.2. Корреляция с туморогенностью 48
2.6.3. Методологические трудности 52
2.6.4. Резюме 53
2.7. Заключение 54
2.8. Указатель литературы 56

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Гипотеза, которую мы хотим рассмотреть, заключается в том, что нормальные и злокачественные клетки в культуре тканей отличаются по одному или более цитоплазматическим признакам, которые вполне определяемы и потому могут надежно служить в качестве индикаторов нормального и злокачественного состояния неизвестных клеток. Так как для тестирования онкогенности in vivo нужно много времени и требуются значительные финансовые расходы, использование простого заменителя данного метода in vitro является крайне важным.

Поиски показателей онкогенности in vitro находились в фокусе интенсивных исследований в течение нескольких десятилетий. В классической литературе изменения клеточной морфологии, кариотипа, прикрепляемости, способности к многослойному росту, поверхностного заряда, скорости роста, плотности насыщения, контактного торможения движения и роста предлагались как возможные показатели онкогенной трансформации. В каждом случае предварительные исследования наводили на мысль о том, что такая корреляция должна существовать. По мере публикации результатов более детальных исследований стало очевидным, что ранние данные были случайными. Как показали последующие исследования, проведенные с широким спектром клеток различных типов, ни одно из этих изменений не может обоснованно рассматриваться как индикатор онкогенности (см. обзоры Sanford, 1965; Weiss, 1967). Таким образом, внимание было переключено на другие клеточные признаки как возможные показатели онкогенности. В данной главе нам хотелось бы обсудить вопрос: какие изменения клеток в культуре могут быть предложены для выявления возможной корреляции с онкогенной трансформацией. Особое внимание будет уделено рассмотрению значительных методологических трудностей и экспериментальных артефактов, которые встречаются при подобных исследованиях и осложняют их интерпретацию. Наконец, мы критически рассмотрим аргументы за и против возможной корреляции онкогенности in vivo и изменений in vitro в организации цитоскелета клеток, зависимости от субстрата, продукции активатора плазминогена и агглютинабельности конканавалином А. В главе 3 мы обсудим взаимосвязь трансформации и изменений клеточной поверхности и плазматической мембраны.

2.1.1. Важность корреляции in vivo

В большинстве опубликованных работ суждения об изменениях клеток, сопутствующих онкогенной их трансформации, были высказаны не на основании предпринятых попыток детального тестирования клеточных линий, используемых для исследования онкогенности in vivo. Клетки классифицировались как нормальные или злокачественные на основании сообщений других лабораторий. При этом предполагалась возможность изменения природы тканей, из которых клеточные линии были получены, и других фенотипических изменений.

Не доказано, что указанные изменения отражают онкогенную трансформацию и то, что клетки подвергаются воздействию агентов, способных ее индуцировать.

Такая классификация, как неоднократно подтверждалось, неправильна, а заключения, исходящие из нее, обычно отвергались результатами последующих исследований клеточных линий с установленным статусом. Ошибки классификации — следствие, по крайней мере, следующих причин: клеточные фенотипы, включая онкогенность, нестабильны в культуре; небольшие различия в методах культивирования быстро приводят к образованию новых видов, поэтому клетки той же номинальной линии, но культивируемые в разных лабораториях, в действительности часто являются различными клетками; опухоли представлены разнообразными типами клеток, некоторые из которых являются нормальными, другие — неопластическими; эффективность трансформации многими онкогенными факторами довольно низка, поэтому обработка клеток онкогенным агентом еще не дает уверенности в том, что трансформация произойдет.

2.1.2. Нестабильность фенотипа и видообразование

Опухолевые клетки in vivo, нормальные и трансформированные клетки в культуре обладают выраженной фенотипической нестабильностью, что является результатом комбинации генотипических изменений, селекции множественных субпопуляций и физиологической адаптации. Двумя наиболее существенными параметрами изменений, которые могут наблюдаться в культуре, являются спонтанная трансформация нормальных клеток и утрата или снижение онкогенности истинно опухолевыми клетками. Оба события взаимосвязаны. Спонтанная трансформация клеток отмечалась для широкого спектра клеточных линий и при настоящих методах культивирования представляется практически универсальным явлением (Gey, 1941; Earle et al., 1943; Sanford et al., 1950; Fogh, Hok, 1958; McAllister, Coriell, 1959; Sanford et al., 1961b, 1970; Evans, Di Paolo, 1975; Montesano et al., 1977; Colburn et al., 1978). Начало спонтанной трансформации непредсказуемо и, вероятно, зависит от тонких деталей методологии культивирования (Sanford et al., 1970). Спонтанная трансформация определялась уже на 8-м пассаже в течение 8—12 недель после начала пассирования культур (Sanford et al., 1950, 1961b, 1970). С практической точки зрения это означает, что клетки, выделенные из нормальных тканей, могут оставаться нормальными в течение 4—6 пассажей в культуре. Предположение о том, что нормальный статус клеток сохраняется вне этих сроков, сразу же становится подозрительным.

Частичная, а иногда полная утрата онкогенности при культивировании также отмечается для разнообразных опухолевых линий (Jacoby, 1943; Earle, 1957; Dawe et al., 1958; De Bruyn, Hansen-Melander, 1962; Foley, Drolet, 1964; Moore et al., 1968; Morgan, Eng, 1972; Jurin, 1973; Sorenson et al., 1978; Jamabasi, Nettesheim, 1979). В некоторых случаях уменьшение онкогенности является прямым

результатом усиления антигенности клеток, которое увеличивает степень иммунного отторжения организмом хозяина и, таким образом, уменьшает частоту выхода трансплантатов (Hewitt, 1978; Jamabasi, Nettesheim, 1979). До сих пор не ясно, действительно ли наблюдалась утрата онкогенного статуса в этих случаях. Практическим следствием таких результатов является то, что клеточная линия, поддерживаемая в культуре в течение длительного времени и не вызывающая опухоли in vivo, не может рассматриваться как нормальная до тех пор, пока однажды не будет установлена утрата ее иммуногенности.

Существуют значительные основания для предположения того, что слабые различия условий культивирования, таких, как тип и концентрация сыворотки, частота субкультивирования, плотность пересева и сбора клеток, создают соответствующее селективное давление, быстро приводящее к видообразованию клеток, отличающихся от исходных (Sanford, 1970; Freedman, Shin, 1974; Tucker, 1977; Varani et al., 1979). Таким образом, существует вероятность, что в двух различных лабораториях клетки, даже если они выделены от общего предка и номинально представляют одинаковую линию, могут в действительности быть полностью различающимися клеточными линиями. В данном случае видообразование происходит либо в результате селективного давления, связанного со слабыми различиями техники культивирования, либо с различного характера генетическими, кариотипическими изменениями и вегетативной рекомбинацией.

Данные литературы и результаты исследований, проведенных в других лабораториях, свидетельствующие о нормальном или опухолевом состоянии определенной клеточной линии, не могут быть признаны действительными для клеток той же номинальной линии, выращиваемых отдельно. Статус клеточной линии в одной и той же лаборатории не может рассматриваться постоянным в течение достаточно длительного периода времени. Попытки установить корреляцию признаков трансформации in vitro и онкогенности in vivo требуют экспериментальной проверки в одно и то же время с одними и теми же клеточными культурами.

2.1.3. Состав опухоли

Опухоли обычно содержат множество различных клеток, одни из которых являются нормальными, другие — неопластическими. Трансформированные клетки не обязательно представлены в большинстве. Нормальные клетки включают фибробласты, хондроциты, макрофаги, лимфоциты, перициты и васкулярные эндотелиальные клетки. Злокачественные клетки обладают двумя или более фенотипами. В некоторых случаях эта фенотипическая мозаика опухолевых клеток отражает независимую трансформацию двух или более различных родительских клеток (Siracky, 1979), в то время как в других случаях она отражает способность генотипически однородной клеточной популяции принимать две или более переменные, но взаимозаменяемые формы (Yang et al., 1977). Как у человека, так и у крыс карци-

номы часто содержат саркоматозные участки (Montesano, 1975; Knowles, Franks, 1978; Schaeffer, Heintz, 1978), которые формируются при трансформации нормальных мезенхимальных тканей, индуцированной соседними раковыми клетками (Goldberg, Pavia, 1979; Huebner et al., 1979). Саркомы и меланомы также способны индуцировать злокачественную саркоматозную трансформацию окружающих нормальных мезенхимальных клеток (Huebner et al., 1979).

Когда эксплантаты готовятся из опухолевой ткани, клеточные линии могут быть выделены как из нормальных, так и опухолевых клеток первичной опухоли и могут содержать один или несколько типов клеток. Таким образом, когда клеточная линия получена из опухоли, нельзя сделать предположение о ее туморогенности, особенно для клеток, растущих в культуре, которые могут быть как нормальными, так и опухолевыми. Подобным образом факт, что опухоль является карциномой, не означает, что злокачественная клеточная линия, выделенная из нее, будет карциноматозной. Нормальный или опухолевый статус таких линий может быть определен только прямым тестом на онкогенность in vivo, а карциноматозная или саркоматозная природа может быть установлена только при гистологическом исследовании как клеток в культуре, так и опухолей, которые они формируют при трансплантации in vivo.

2.1.4. Эффективность трансформации

Простая обработка клеток трансформирующими агентами не обязательно приводит к их трансформации. Частота трансформации онкогенными вирусами и химическими канцерогенами для многих перевиваемых культур редко превышает 50 %, а нередко бывает на один и более порядков меньше. Некоторые онкогенные вирусы обычно обладают очень низкой эффективностью трансформации (Rabson, Kirschstein, 1962; Shein et al., 1963). К ним относятся SV 40, полиомавирусы (Kurimura, Hirano, 1972; Sioker, MacPherson, 1961; Medina, Sachs, 1961; Sanford, 1965) и аденовирусы (Kurimura, Hirano, 1972; Harwood, Gallimore, 1975; Chen, 1976; Gallimore, 1977). Множество химических канцерогенов обладает сравнительно низкой эффективностью трансформации (см. обзор Sanford, 1965). Таким образом, в поисках корреляции некоторых клеточных характеристик с туморогенностью нормальное или неопластическое состояние клеток должно быть установлено прямой пробой in vivo и не может считаться достоверным только на основании воздействия потенциально трансформирующим агентом.

2.2. ПРОБЫ НА ОНКОГЕННОСТЬ IN VIVO

Первые этапы исследований, связанные с тестированием онкогенности in vivo, состояли во введении животному ткани, выделенной от другого животного того же вида (Little, Tyzzer, 1916; Schrek, 1936). Частота успешной трансплантации была обычно сравнитель-

но низкой, а прогрессивный рост опухоли в результате трансплантации скорее был отражением метода, чем свидетельством истинной онкогенности. Большинство источников артефактов и вариабельности результатов включает способ приготовления ткани, путь инокуляции, объем инокулята, период наблюдения, число инокулированных животных и, что наиболее важно, иммуногенность опухоли.

2.2.1. Изогенные трансплантаты

Хотя неудача при росте in vivo может означать, что трансплантат ткани является незлокачественным, она может также означать, что ткань слишком иммуногенна для реципиента. Таким образом, истинный тест на онкогенность может быть осуществлен у животных, которые совершенно не способны отторгать трансплантат по иммунологическим причинам (Handler et al., 1956; Jones et al., 1975). В принципе, иммунное отторжение можно избежать при трансплантации ткани изогенным хозяевам с тем же локусом гистосовместимости, что у животного, от которого исследуемая ткань была выделена. Практически этот тест зачастую неудачен. Действительно, спонтанные опухоли, трансплантированные сразу же после их первичного выделения, обычно обладают высоким выходом при трансплантации изогенным хозяевам (Hewitt, 1978). Однако большинство используемых экспериментальных опухолей — вирус- или химически индуцированные. Они обычно тестировались в колониях животных, отличающихся от первоначального происхождения, и поддерживались в культуре или с помощью трансплантации in vivo в течение длительного промежутка времени.

В противоположность спонтанным опухолям вирус- и химически индуцированные опухоли обладают выраженной иммуногенностью (Toley, 1953; Prehn, Main, 1957; Outzen, Prehn, 1973; Prehn, 1975; Klein G., Klein E., 1977). Эта иммуногенность, по-видимому, обусловлена вторичным эффектом трансформирующих агентов. Как трансплантаты химически и вирус-индуцированные опухоли часто подвергаются отторжению организмом хозяина и обладают низким выходом (Hewitt, 1978). Это одна из причин отторжения экспериментальных опухолей. Другая — заключается в образовании различных подвидов животных того же номинального вида по гистосовместимости в результате их размножения в разных лабораториях (Hewitt, 1978). Различия гистосовместимости могут развиваться быстро, особенно в тех случаях, когда колонии животных подвергаются воздействию трансмиссивных вирусов (Graff et al., 1975; Hewitt, 1978). Опухоль животного одной колонии может, следовательно, не расти у хозяев того же номинального вида, но другой колонии, потому что онкогенность развивалась в результате полной утраты гистосовместимости. Последняя причина неадекватной онкогенности изогенных трансплантатов — фенотипическая нестабильность клеток в культуре тканей и в опухолевых линиях in vivo при серийной трансплантации.

Изменения иммуногенности клеток в культуре уже обсуждались. In vivo такие изменения могут быть результатом необычно высокой вариабельности кариотипа и одержания ДНК, которые всегда обнаруживаются в опухолевых клетках (Sandberg, 1974; Wolman, Horland, 1975). Частое отклонение опухолевых клеток от нормальных по плоидии, числу хромосом и их структуре, как правило, постоянный и прогрессирующий процесс. Его биологическое значение не выяснено, однако в принципе оно представляет потенциально мощный механизм вегетативной рекомбинации, что, вероятно, ведет к прогрессивной селекции внутри опухолевой клеточной популяции генотипов, лучше приспособленных к организму хозяина.

2.2.2. Иммунологически привилегированные места

Успехи трансплантации опухолей явились в основном результатом предотвращения иммунного отторжения организмом хозяина. Наиболее ранний успех возник от познания того, что определенные анатомические места обладают ослабленной иммунной способностью и, следовательно, являются иммунологически привилегированными. Первым привилегированным местом, которое использовалось для трансплантации опухоли, была передняя камера глаза (Grossi, 1960). В последующем мозг, брюшная полость, защечные мешки хомячка также оказались привилегированными местами.

Передняя камера глаза морской свинки, как было доказано, является приемлемым местом оценки туморогенности; частота выхода опухолей человека умеренно высока и колеблется от 39 % для первичных опухолей до 64 % для метастазирующих и рецидивирующих опухолей (Greene, 1952). Однако хирургическая техника, требуемая данным методом, трудна, размеры ткани малы, а количественная оценка неустойчива (Giovanella et al., 1976).

Внутричерепная трансплантация, также трудна для осуществления, дает еще более ошибочные результаты и обычно является неадекватным методом тестирования туморогенности (Giovanella, Fogh, 1978)

Брюшная полость — удобное место для трансплантации суспензий опухолевых клеток и имеет значительные преимущества ввиду легкости и быстроты осуществления метода, возможности введения в нее высокой концентрации клеток. Определенные типы опухолей при интраперитонеальном введении обладают высокой частотой выхода (Hagmar, Norrby, 1973; Shin et al., 1975). Однако большинство других не растет при этом вовсе или требует длительной адаптации в культуре прежде, чем приобретет способность расти после интраперитонеального введения в качестве асцитных суспензий (Klein G., Klein E., 1956). Таким образом, место инокуляции не является абсолютным показателем тестирования туморогенности.

Защечный мешок хомячка также не является лучшим местом для роста тканевых трансплантатов. Хотя некоторые опухоли, например человеческие меланомы (Patterson, 1968), растут довольно хорошо в защечном мешке. Большинство же такой способностью не облада-

ет. Типичная частота выхода гетеротрансплантатов в защечном мешке составляет приблизительно 10—15 %, и около трети привившихся трансплантатов не способны к прогрессивному росту (Handler et al., 1956; Patterson et al., 1957). Большинство человеческих опухолей отторгается в защечном мешке, а те из них, которые успешно трансплантируются, являются быстрорастущими и низкодифференцированными (Patterson, 1968). В защечном мешке хомячка часто появляются гранулемы, которые легко можно спутать с растущим опухолевым трансплантатом (Giovanella, Fogh, 1978).

2.2.3. Иммунодефицитные хозяева

Животные с естественно дефицитной иммунной системой обеспечивают альтернативу использования привилегированных мест при оценке туморогенности. Три типа естественно встречающихся иммунодефицитных хозяев использовались для этой цели: хорионаллантоисная оболочка куриных эмбрионов (ХАО), эмбриональные или новорожденные млекопитающие и бестимусные, или nude (безволосые), мыши.

Выращивание гетерологических опухолей на ХАО является обычно низкочувствительным методом тестирования туморогенности. Частота выхода ниже, чем при большинстве других методов, так как вследствие быстрого развития куриных эмбрионов данная техника пригодна лишь для кратковременных исследований в течение нескольких дней (Moore, 1958; Giovanella, Fogh, 1978).

Эмбриональные и новорожденные животные интенсивно использовались в исследованиях по опухолевой трансплантации (Gallagher, Korson, 1959; Kutner, Southam, 1960; Ebbesson et al., 1977). Хотя частота выхода опухолей значительно варьировала в зависимости от типа донорской ткани, у эмбриональных и новорожденных хозяев она составляла или превышала таковую при использовании любых иммунологически привилегированных мест. Трансплантация тестируемых тканей новорожденным животным является простым и быстрым методом, но еще лучшие результаты могут быть достигнуты при использовании иммуносупрессированных новорожденных хозяев (Forsberg, Nordqvist, 1969; Adams et al., 1970; Gallimore et al.. 1977).

Безволосые мыши утрачивают тимус и становятся дефицитными по Т-клеточному иммунитету, хотя они обладают значительной активностью естественных киллеров. Большое преимущество безволосых мышей для пробы на туморогенность — толерантность к широкому спектру нормальных и опухолевых ксенотрансплантатов млекопитающих (см. обзор Giovanella, Fogh, 1978). Их недостатки — восприимчивость к патогенной инфекции и высокая стоимость. Так же, как и у новорожденных реципиентов, частота выхода у безволосых мышей значительно зависит от типа трансплантируемой ткани. При изучении 388 человеческих опухолей Sharkey и соавт. (1978) сообщили об успешной трансплантации почти в 90 % случаев и о прогрессивном росте в 31 % случаев. Только 12 % трансплантатов отторгались

без каких-либо признаков роста. Прогрессивный рост был наивысшим для рецидивирующих (54 %) и метастазирующих опухолей (49 %), а наименьшим — для первичных опухолевых трансплантатов (27 %). Из опухолей, растущих в первичных трансплантатах, наиболее высоким был выход опухолей легких (41 %) и костей (31 %), в то время как опухолей грудной железы составлял только 8 % (Fogh et al., 1979).

2.2.4. Иммуносупрессированные хозяева

Животные могут быть иммунологически супрессированы с помощью некоторых средств, включая облучение всего организма, лечение кортикостероидами, антилимфоцитарную сыворотку (АЛС) и тимэктомию (Toolan, 1951; Toolan, 1953; Moore, 1958; James, 1967). Все четыре метода увеличивают выход опухолей, особенно при использовании во взаимодействии с иммунодефектными реципиентами. Кортизон и рентгенооблучение могут увеличить частоту прогрессивного роста в защечном мешке хомяка гетеротрансплантатов человеческой опухоли в 5 раз (Handler, 1956). Обработка хозяев АЛС дает равное или большее увеличение выхода опухолевых гетеротрансплантатов в защечном мешке как у новорожденных, так и взрослых реципиентов и у безволосых мышей (Forsberg, Nordqvist, 1969; Lewis et al., 1969; Adams et al., 1970; Giovanella et al., 1976; Owen, 1976).

В нескольких случаях обработка АЛС вызвала выход опухолей у 75 % животных, причем эти опухоли вовсе не прививались у нелеченых хозяев (Forsberg, Nordqvist, 1969; Lewis, 1969). В общем выход опухолей у хозяев, обработанных АЛС, приблизительно соответствует таковому у нелеченых безволосых мышей (Chew et al., 1976; Gallimore et al., 1977). Тимэктомия новорожденных хозяев вызывает увеличение прививаемости опухолей, которое сравнимо с результатами, полученными при обработке животных АЛС (Osoba, Auersperg, 1966). У отъемышей тимэктомия также увеличивает выход опухолей, но не в такой степени, как у новорожденных (Cook et al., 1969). В настоящее время наиболее успешным методом опухолевой трансплантации является использование тимэктомированных при рождении хозяев, летально облученных на фоне пересадки костного мозга от сингенных животных и обработанных АЛС. Этот метод постоянно вызывает выход опухолей приблизительно в 60—80% случаев и прогрессивный рост в 35—65 % случаев (Castro, 1972; Cobb, 1973; Berenbaum et al., 1974; Pickard et al., 1975).

2.2.5. Приготовление клеток и путь инокуляции

Хотя иммунное отторжение является, вероятно, единственной наиболее важной причиной несостоятельности многих истинно опухолевых тканей индуцирование опухоли in vivo и выход новообразований также зависят от способа приготовления тестируемых клеток и пути их инокуляции животным. Культивируемые клетки обычно трансплантируются хозяевам-реципиентам в виде клеточных сус-

пензий, приготовленных с помощью диссоциации протеазами или этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТК). Оба агента высоко токсичны и вызывают очевидный лизис одних клеток и в то же время ухудшение жизнеспособности других (Owens, 1953; Skehan, Friedman, 1975; McKeehan, 1977; Smets, 1979). Обработка неопластических тканей химическими и энзиматическими диссоциирующими агентами может на порядок уменьшить выход опухолей (Cobb, 1973; Rein, Shin, 1978; Smets et al., 1979) и подействовать таким же образом на частоту появления метастазов (Grossi et al., 1960; Agostino, Clifton, 1962). Токсичность трипсина рассматривается как важная причина трудности получения нормальной клеточной линии с бесконечной продолжительностью жизни (Sanford, Hoemann, 1967). Хотя перевиваемые линии обычно приобретают некоторую степень устойчивости к токсичности диссоциируемых агентов, при пассировании они частично утрачивают эту устойчивость (McKeehan, 1977; Smets et al., 1979). Результаты исследований, проведенных в нашей лаборатории, показали, что лизис, вызываемый трипсином или диссоциацией ЭДТК, составляет 10—20 % для стационарных линий и 40—80 % для культур на ранних пассажах. Таким образом, индуцированные диссоциацией лизис и смертность клеток должны рассматриваться как серьезные источники артефактов в пробах на туморогенность.

Однако опухолевая клеточная популяция может быть приготовлена и путь ее инокуляции в организм хозяина оказывает значительное влияние на ее дальнейшую судьбу и поведение. По крайней мере, использование иммунологически привилегированных мест может повысить частоту выхода опухоли на порядок по сравнению с таковой при подкожной инокуляции. Более того, существуют значительные регионарные различия характера опухолевого роста, длительности латентного периода, частоты выхода опухоли от одной части организма хозяина к другой. Например, существует передне-задний градиент прививаемости внутрикожно трансплантируемых опухолей в латеральной части туловища мыши (Auerbach et al., 1978). Краниальные, ближе к черепу, места обеспечивают в 2—4 раза выше частоту выхода, существенно более короткий латентный период и увеличение объема опухоли (на порядок по сравнению с каудальными местами). Этот количественный градиент наблюдается также при подкожной инокуляции и характерен для различных типов опухолей (Auerbach et al., 1978).

Наиболее общие пути инокуляции клеток в пробах на туморогенность — внутрибрюшинный (в/б), внутрисосудистый (в/с), внутрикожный (в/к), внутримышечный (в/м) и подкожный (п/к). Для большинства опухолей значительно лучшие рост и частота выхода по сравнению с другими характерны при нескольких путях инокуляции. Можно отметить достаточно резонное обобщение, заключающееся в том, что в/с и в/б-пути инокуляции наиболее низки по эффективности (Takahashi, 1915; Klein G., Klein E., 1956; Cobb, 1973; Hagmar, Norrby, 1973; Stragand et al., 1979). В обоих случаях низкая частота выхода и слабый рост после инокуляции, вероятно, отражают зависи-

мость опухолевых клеток от субстрата. Эта тема будет вскоре детально обсуждаться.

Некоторые виды опухолевых клеток обладают высокой частотой выхода только при инокуляции в специфические анатомические места. Карцинома молочной железы чрезвычайно трудно трансплантируется в обычные места, но дает высокую частоту выхода при имплантации в жировые подушечки молочной железы (Outzen, Custer, 1975). Частота выхода других опухолей зависит от путей введения их клеток. Так, Epstein и соавт. (1976) редко удавалось успешно трансплантировать лимфосаркому человека п/к, в/м или в/б путями безволосым мышам, однако авторы получали 90 % выхода при внутримозговой имплантации. Клоны, изолированные из единичной родительской опухоли, также обладают различным характером роста в зависимости от пути трансплантации in vivo. Из шести клонов крысиной фибросаркомы AS-653 для четырех характерна наиболее высокая частота выхода при п/к имплантации, в то время как для двух наиболее успешным был в/б путь введения (Koyama et al., 1979). Исключая наименее чувствительный в/с путь введения, наилучший эффект способа инокуляции зависит от индивидуальных характеристик каждой опухоли. Некоторые дают наиболее высокую частоту выхода при п/к инокуляции, другие успешнее трансплантируются при в/б, в/м или внутричерепной имплантации (Takahashi, 1915; Adams et al., 1970; Cobb, 1973; Hagmar, Norrby, 1973; Epstein et al., 1976; Koyama et al., 1979; Lueker et al., 1979; Stragand et al., 1979).

2.2.6. Прогрессивный рост нормальных клеточных трансплантатов

В адекватном тесте на туморогенность существуют различия между неопластическими и нормальными тканями. В позитивных пробах тестируемая ткань должна успешно трансплантироваться хозяевам-реципиентам, а затем проявлять в некоторой степени прогрессивный рост. Адекватные системы, следовательно, должны быть неспособными поддерживать прогрессивный рост нормальных тканей. Даже в случае выполнения этого условия чрезвычайно трудно установить различия между истинной опухолью с медленным или ограниченным прогрессивным ростом и простой пересадкой нормальной ткани, которая увеличивается в результате формирования местной соединительнотканной реакции, воспаления или травмы.

Более того, разнообразные виды нормальных тканей могут быть с успехом трансплантированы любому хозяину, который иммунологически ослаблен. У безволосых мышей, например, приживляются кожные ксенотрансплантаты крыс, человека, кошек, птиц, ящериц, древесных лягушек, а также трансплантаты органов широкого круга доноров от человека до рыб, разнообразные нормальные клеточные инокуляты, такие, как костный мозг и лимфоидные клетки (см. обзор Reed, Manning, 1978). В некоторых случаях эти трансплантаты сохраняют свойства дифференцировки, не растут прогрессивно, однако в других — наблюдаются дедифференцировка, митоз и даже инвазия.

В последнем случае установить различия нормального и неопластического состояний сложно, так как требуется сочетание длительного наблюдения и последующего гистологического анализа. Обычен факт, что прогрессивно растущие эмбрионы сформированы из нормальных эмбриональных клеток (Sanford et al., 1961b), в то время как гранулемы, как правило, встречаются в определенных системах хозяев, в таких, как защечный мешок хомячка (Giovanella, Fogh, 1978). Опять же необходим гистологический анализ для того, чтобы определить, являются ли эти ткани нормальными или опухолевыми.

Особая проблема возникает с тканями, зависимыми от субстрата, так как, пока они не прикрепятся либо к твердому субстрату, либо к другим клеткам в пределах многоклеточного агрегата, для них характерна высокая смертность. При введении суспензии единичных клеток субстратнозависимые клетки обычно погибают, и, следовательно, нельзя ожидать, что они вызовут опухоли с какой-либо частотой выхода, даже если они являются высоко злокачественными. Та же линия может характеризоваться высокой частотой выхода и прогрессивным ростом при условии имплантации либо в виде многоклеточных агрегатов, либо прикрепленной к соответствующему твердому субстрату. Наоборот, рост in vivo прикрепленной клеточной популяции не обязательно отражает туморогенность. Это позволяет аргументировать, что прикрепление представляет собой патологическую ситуацию, которая дает возможность совершенно нормальной клеточной линии расти при соответствующих условиях, в то время как обычно она не способна к этому. В качестве альтернативы можно предполагать, что прикрепление к искусственному субстрату ускоряет спонтанную трансформацию и что прогрессивный рост — результат пролиферации клеточных клонов, выделенных из предшественников, подвергшихся трансформации вслед за имплантацией. Таким образом, прогрессивный рост in vivo при имплантации субстратнозависимой линии, прикрепленной к твердому субстрату, может отражать нормальный статус, первичную туморогенность или индуцированную в течение пробы на онкогенность трансформацию. Достоверных методов для определения различий этих альтернатив до настоящего времени не существует.

Установлены две стационарные линии, наиболее часто используемые в качестве нормальных контролей в пробах на туморогенность, это — клетки 3Т3 и С3Н/10Т$\frac{1}{2}$/С18. Обе не вызывают опухоли при инокуляции в виде суспензии единичных клеток, но формируют быстро и прогрессивно растущие злокачественные опухоли при имплантации прикрепленными к твердым субстратам (Boone et al., 1976, 1979). Большинство исследователей пренебрегали этими фактами и продолжают предполагать, что обе клеточные линии — нормальные, хотя нет экспериментальных доказательств подобного предположения. Эти линии являются основой для многих предположений о наличии различных коррелятов туморогенности, а неустановленная их природа вносит существенные сомнения в интерпретацию значительной части литературы по коррелятам туморогенности. Необхо-

димо отметить, что третья установленная линия клеток BHK21/C13 хомячка, которая наиболее часто использовалась как нормальный контроль в исследованиях на туморогенность, в действительности явно опухолевая (Defendi et al., 1963; MacPherson, 1963; Stoker, MacPherson, 1964; Schoental, 1967; Friedman, Shin, 1974; Berman, 1975; Kahn, Shin, 1979). Заключения о коррелятах туморогенности, основанные на нормальном состоянии этой линии, неправильны.

2.3. КЛЕТОЧНАЯ МОРФОЛОГИЯ

2.3.1. Цитологические корреляты

Морфологические изменения были обнаружены среди первых клеточных эффектов, наблюдаемых в клеточных культурах сразу после воздействия трансформирующими агентами (Earle, Nettleship, 1943), и несколько лабораторий даже представили (с нашей точки зрения анекдотичные) доказательства изменений цитологических особенностей, таких, как размер и форма клетки, кариотип, ядерное число, морфология ядра, ядерно-цитоплазматическое отношение, характер цитоплазматической окраски вследствие онкогенной трансформации (Sanford, 1965; Montesano et al., 1977). Однако несколько попыток было предпринято для определения статистической корреляции между цитологическими признаками и туморогенностью. В одном из самых ранних исследований (Sanford et al., 1950) обследовали пять отдельных видов фибробластов мышей от их первоначального выделения до саркоматозной трансформации. Наблюдая множество морфологических изменений, они не смогли обнаружить такое из них, которое коррелировало бы с туморогенностью.

Последующие исследования подтвердили утрату индивидуальных морфологических коррелятов туморогенности при световой микроскопии в системе фибробластов (см. обзор Sanford, 1965). Недавно было обращено внимание на эпителиальные клеточные линии. При наблюдении за 15 различными цитологическими признаками Montesano и соавт. (1977) обнаружили, что базофилия цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическое отношение индивидуально коррелировали с онкогенностью эпителиальных линий печени крысы. Оба коэффициента корреляции превышали 0,7, и в обоих случаях различия были существенны при уровне значимости $p \leqslant 0{,}01$. Для других из 13 обследованных признаков не обнаружена существенная корреляция с туморогенностью. Однако когда классификация основывалась на совместном рассмотрении всех 15 цитологических признаков, а не на единичных индивидуальных особенностях, то нормальные и опухолевые линии отличались друг от друга в 94 % случаев (Montesano et al., 1977). Использование множественных критериев обеспечивает также возможность определения различий нормальных и опухолевых линий фибробластов, если индивидуальный цитологический признак не существенно коррелирует с туморогенностью (Barker, Sanford, 1970).

2.3.2. Цитоскелет

Изменения числа и организации микрофиламентов и микротрубочек, как утверждалось, коррелируют с онкогенной трансформацией. Многие лаборатории сообщали об уменьшении в системах клеточных культур числа видимых микрофиламентов или дезорганизации и утрате параллельных микрофиламентозных пучков или тяжей после воздействия потенциально трансформирующими агентами (McNutt et al., 1973; Dermer et al., 1974; Goldman et al., 1974; Weber et al., 1974; Pollack, Rifkin, 1975; Wickus et al., 1975; Pollack, Rifkin, 1977). Во всех цитируемых работах использовались онкогенные вирусы в качестве трансформирующих агентов и эмбриональные или 3Т3-клетки как мишень для трансформации. Ни в одном из этих исследований не тестировались на туморогенность клеточные линии, применяемые в опытах in vivo. Статус линий, следовательно, был неизвестным, что отвергает любые заключения о связи микрофиламентов с туморогенностью.

Более недавние исследования туморогенности in vivo, не подтвердили эти заявления. Хотя в одной работе сообщалось об уменьшении и истончении тяжей актина для некоторых спонтанно трансформированных линий грызунов (Tucker et al., 1978), другие исследователи не обнаружили корреляцию онкогенности и числа или организации микрофиламентов в системе клеточных культур (Goldman et al., 1976; Asch, 1979; Barrett et al., 1979).

Экспериментальные методы, применяемые для изучения связи микрофиламентов и туморогенности источник нескольких серьезных ошибок, включая вариацию локальной частоты микрофиламентов от одной области цитоплазмы к другой, отсутствие согласованности результатов подсчета у двух различных исследователей, наблюдавших одни и те же микрофотографии, количественные различия (вдвое) от анализа одного эксперимента к анализу следующего, стандартные колебания до 50 % среднего значения (Goldman et al., 1979; Asch et al., 1976). Эти ошибки достаточно велики, чтобы не считать действительными заключения, сделанные в большинстве опубликованных работ. Данные, полученные при изучении культур, противоречили нескольким исследованиям тканей in vivo, в которых указывалось о большем числе микрофиламентов в опухолях по сравнению с нормальными клетками (Malech, Lentz, 1974; Asch et al., 1976; Gabbiani et al., 1976; McNutt, 1976; Toh et al., 1977), хотя эти исследования могут быть подвергнуты критике по тем же соображениям, что и опыты in vitro.

Предполагалось также, что уменьшается число цитоплазматических микротрубочек и они становятся дезорганизованными вследствие онкогенной трансформации (Brinkley, 1975; Edelman, Yahara, 1976; Miller et al., 1977). Эта гипотеза основана на наблюдении в трансформированных клетках интенсивного диффузного окрашивания меченными флюоресцеином антителами к тубулину, при котором индивидуальные микротрубочки труднее распознаются. Однако в исследованиях, которые послужили основанием для этой гипотезы,

в действительности не определялась туморогенность in vivo использованных клеточных линий. Последующее изучение нормальных и неопластических тканей установленного статуса не подтвердило данную гипотезу. Наоборот, установлен факт утраты корреляции туморогенности с числом или организацией внутриклеточных микротрубочек (De Mey et al., 1979, Tucker et al., 1978; Asch et al., 1978).

При изучении микротрубочек и микрофиламентов в клеточных линиях, используемых в качестве нормальных контролей, наблюдалось явное уплощение клеток с широко распластанной тонкой ламеллоплазмой, в то время как трансформированные клетки становились округлыми или компактными с несколькими участками прикрепления ламеллярной ножки. Видимые различия организации цитоскелета нормальных и трансформированных линий, вероятно, в большинстве случаев являются результатом оптического артефакта, вызванного различной клеточной геометрией. При широкой распространенности ламеллоплазмы микрофиламенты и микротрубочки ориентированы параллельно главной оси в виде единичного тонкого слоя, который является почти двухмерным. При осмотре в флюоресцентном микроскопе после иммунофлюоресцентного окрашивания почти все филаменты и трубочки в ламеллярной ножке выглядят в глубине поля в виде единичного фокусируемого участка и рассматриваются в продольном сечении, что делает их заметными визуально. В округлых клетках сеть цитоскелета ориентирована в трех измерениях. Индивидуальные элементы внутри этой сети распространены по всем направлениям. В результате не видно глобальной организации, хотя локальная — значительна. Больше того, многие элементы цитоскелета наблюдались на поперечном срезе скорее, чем на продольном, что затрудняло их определение, давая ложное представление о меньшем их числе, чем оно есть в действительности (Goldman et al., 1976; Osborn, Weber, 1977; Willingham et al., 1977; Tucker et al., 1978; Asch et al., 1979).

Подобный артефакт отмечается при трансмиссионной электронной микроскопии (Goldman et al., 1976; Osborn, Weber, 1977; Asch et al., 1979). В округлые клетки, находящиеся вне фокуса, свет проникает из других частей цитоплазмы фокусируемой зоны сверху или снизу от поля зрения, сливаясь таким образом с изображением, и создает диффузную фоновую иллюминацию, которая затмевает микрофиламенты и микротрубочки при осмотре в флюоресцентном микроскопе (Edelman, Yahara, 1976; Osborn, Weber, 1977). Эта диффузная фоновая иллюминация не наблюдается в плоских клетках, так как вся цитоплазма ламеллярной ножки находится в единичном фокусе. Конечный источник артефакта при изучении флюоресцирующих препаратов — уплотнение окрашенных флюоресцеином элементов цитоскелета. Если две микротрубочки, например, лежат в пределах 55 нм одна от другой, они не могут быть обнаружены на уровне световой микроскопии и будут иметь вид единичной флюоресцирующей полосы диаметром около 200 нм (Osborn, Weber, 1977). Этот эффект уплотнения уменьшает действительное число элементов цитоскеле-

та и создает диффузный флюоресцирующий фон, что скрывает индивидуальные микрофиламенты и микротрубочки от наблюдения (Goldman et al., 1976; Osborn et al., 1978).

2.3.3. Резюме

Имеющиеся в наличии данные не оправдали ожиданий какой-либо корреляции туморогенности и числа или организации микрофиламентов или микротрубочек. Предположения о том, что такая корреляция существовала in vitro для клеточных линий, как доказано, необоснованны и возникли в результате наслоения экспериментальных погрешностей, включая неудачи тестирования in vivo туморогенности и, как следствие, общую ошибочную классификацию состояния клеток; использования в качестве «нормальных» контролей клеточных линий, которые (почти без сомнения) были аномальными; избытка уверенности в том, что вирусная инфекция (вероятно, следствие неадекватной методики) индуцирует предполагаемую трансформацию; использования субъективных и ошибочных качественных методик вместо количественных морфометрических; статистического анализа данных и учета общих оптических артефактов.

Отдельные цитологические характеристики сами по себе также не могут быть признаками туморогенности. Однако совокупность многих цитологических критериев может служить надежным индикатором туморогенности, по крайней мере, двух специфических клеточных систем крыс (Barker, Sanford, 1970; Montesano et al., 1977) и представляет существенный интерес в связи с вопросом, может ли данный подход иметь более общее применение.

2.4. ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СУБСТРАТА

2.4.1. Предпосылка

Большинство клеток млекопитающих, происходящих из солидных тканей, лучше растет и более жизнеспособно в условиях прикрепления к поверхности или субстрату, чем в клеточной суспензии, свободной от таких контактов. Этот эффект назван зависимостью от субстрата (Stiker et al., 1968). Рост нормальных клеток, недавно выделенных из тканей млекопитающих в культуре, как правило, обнаруживает выраженную зависимость от субстрата. Наоборот, стационарные клеточные линии, известные как онкогенные, часто независимы от субстрата или обладают значительно сниженной зависимостью от него. Это привело к гипотезе об утрате зависимости от субстрата в культуре как показателе онкогенной трансформации (MacPherson, Montagnier, 1964; Friedman, Shin, 1974; Weinstein et al., 1975; Jones et al., 1976; Pollack, Rifkin, 1977).

В 1964 г. независимо друг от друга Burford, Sanders и MacPherson, Montagnier описали технику культивирования в геле, что дало

возможность оценить зависимость роста клеток в суспензии от субстрата. Метод заключается в посеве популяции клеток на неадгезивную поверхность. Перед посевом клетки находились во взвешенном состоянии либо в предварительно нагретом агаре, который становился гелем при охлаждении, либо в вязкой среде, такой, как метилцеллюлоза. Неадгезивной поверхностью была тонкая пленка (0,5—1 % прегелевого агара), покрывающая поверхность чашки для культивирования, что предотвращало прикрепление клеток. Агар со взвешенными в нем клетками, становясь гелем, удерживал индивидуальные клетки на месте и предотвращал прикрепление их друг к другу путем столкновения и агрегации. В этих пробах обычно используются неочищенный агар и очищенная агароза. Концентрации, используемые в суспензионном слое, едва превышают минимальные значения, необходимые для гелеобразования, и метод часто называется клонированием в мягком агаре. Вместо мягкого агара иногда использовалась метилцеллюлоза, которая, будучи жидкой и достаточно вязкой, эффективно предотвращает агрегацию клеток.

Идеально, когда в пробах с гелевыми культурами все пересаженные клетки существуют первоначально как единичные изолированные клетки, не образующие адгезивный контакт с другими клетками или с субстратом. Те клетки, которые требуют для своего роста прикрепления к субстрату, теоретически не способны пролиферировать. Наоборот, клетки, не нуждающиеся в прикреплении, способны делиться и формировать прогрессивно увеличивающуюся многоклеточную колонию. Результаты такой пробы обычно выражаются в проценте клеток, способных формировать многоклеточные колонии в инокуляте. Эта величина обозначается как колониеобразующая активность (КОА).

2.4.2. Корреляция колониеобразующей активности с туморогенностью

В поисках корреляции колониеобразующей активности и туморогенности мы классифицировали клетки по четырем отдельным категориям. Первая категория состоит из клеточных линий, которые могут быть туморогенными благодаря их способности формировать опухоли in vivo, вторая — из клеточных линий, выделенных из нормальных тканей, которые не формировали опухоли in vivo, никогда не подвергались воздействию потенциально трансформирующими агентами и о туморогенности которых никогда не сообщали другие лаборатории и, следовательно, которые рассматривались как нормальные. Третья категория включает клеточные линии, которые исследователи, осуществлявшие пробу на КОА, считали нетуморогенными, но которые подвергались воздействию онкогенными агентами или были выделены из злокачественной ткани. Окончательное заключение о нормальном статусе данной линии клеток не может быть сделано в связи с ограниченным числом исследований по изучению их туморогенности, а также с наличием кроме КОА других фенотипических

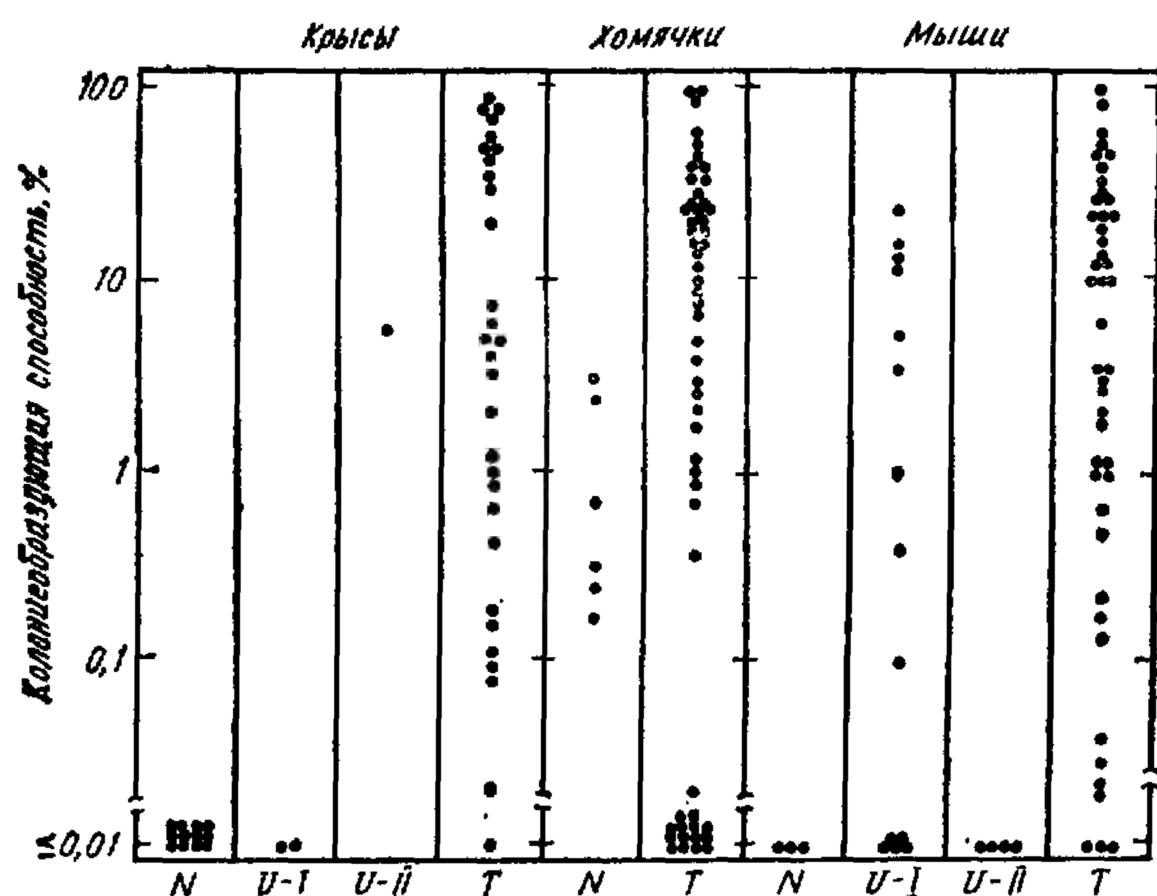


Рис. 1. Обобщение литературных данных о связи между туморогенностью in vivo и колониеобразующей активностью in vitro для крысиных, хомячковых и мышиных клеточных линий. Клетки классифицированы по четырем категориям: нормальные клеточные линии (*N*), которые не образуют опухоли in vivo; туморогенные линии (*T*), которые формируют опухоли in vivo; два класса клеточных линий с неопределенным статусом (*U*-I и *U*-II). Указанные данные были собраны из следующих источников: Aden Knowles, 1977; Barrett et al., 1979; Berman, 1975; Colburn et al., 1978; Freedman, Shin, 1974; Gallimore et al., 1977; Hince, Roscoe, 1978; Jones et al., 1976; Kahn, Shin, 1979; Kakanuga, Kamahora, 1968; Knowles, Franks, 1978; Leavitt et al., 1977; Marciani et al., 1976; McFarland et al., 1975; Montagnier, 1969; Nomura et al., 1974; Rifkin, Pollack, 1977; San et al., 1979; Steuer et al., 1977; Tatsumi et al., 1979. Tucker et al., 1977, 1978; Weiss et al., 1973.

особенностей. Поэтому клетки не формируют опухоли при трансплантации скорее из-за иммунного отторжения организмом хозяина, чем в связи с нормальным статусом. Эти клетки обозначены как линия U-1 неопределенного статуса. Четвертая категория состоит из клеточных линий, не тестированных на туморогенность, но выделенных из злокачественной ткани, а также бывших неонкогенными у одних исследователей и онкогенными у других при изучении корреляции онкогенности и КОА. Такие клеточные линии были обозначены как U-2-линии неопределенного статуса. В эту группу включены линии 3T3 и C3H/10T$\frac{1}{2}$/CL8, нетуморогенные при инокуляции в виде клеточных суспензий, но способные формировать опухоли при инокуляции, будучи прикрепленными к субстрату (Boone et al., 1976, 1979).

Данные литературы по изучению КОА для линий клеток крыс, мышей, хомячков и человека суммированы на рис. 1 и 2. Результаты анализа проб с неочищенным агаром, агарозой и метилцеллюлозой объединены.

Нормальные клеточные линии крыс обладали очень низкой КОА ($\leqslant$ 0,01 %), так же как и линии U-1 с неопределенным статусом (рис. 1). Только линия U-2, имеющая некоторые фенотипические особенности, обладала умеренной (около 5 %) КОА (Gallimore et

al., 1977). Это была линия клеток крыс не явно онкогенная, для которой КОА превышала 0,01 %. Наоборот, 31 из 32 туморогенных клеточных линий крыс имела КОА свыше 0,01 %, а 16 из 32 — 5 % и более. На основании данных, суммированных на рис. 1, можно заключить, что туморогенные клеточные линии крыс как группа обнаруживают намного более высокую КОА, чем нормальные линии. Низкая КОА не может рассматриваться как необходимый показатель нормального состояния клеточной линии крыс, умеренная или высокая КОА — может.

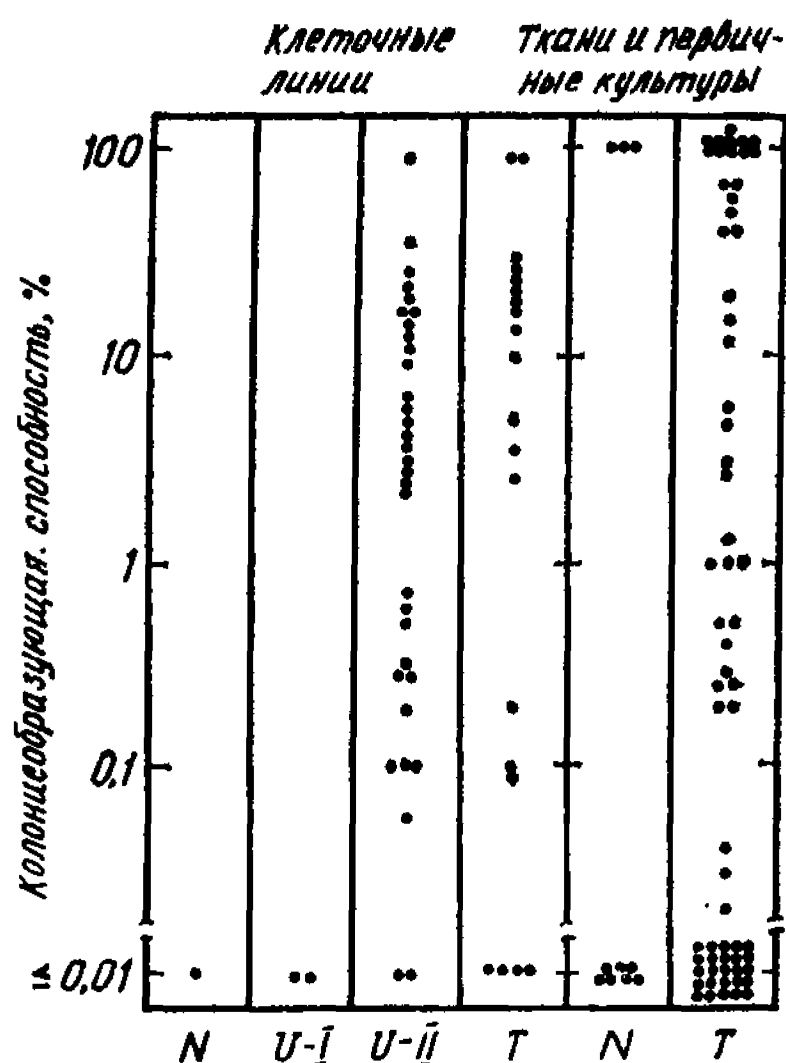
Клетки хомячка отличаются от клеток других видов животных тем, что они имеют необычно большое число туморогенных линий с очень низкой КОА ($\leqslant$ 0,01 %) и нормальных с умеренно высокой КОА. Низкая КОА не показательна для нормального статуса клеточных линий хомячка, так же как умеренная КОА — для трансформации. Однако можно предположить, что высокая КОА ($\geqslant$ 10 %) может рассматриваться как предварительный показатель туморогенности.

Ситуация с клеточными линиями мышей менее ясна. Все шесть нормальных мышиных линий, представленных на рис. 1, имели очень низкие значения КОА ($\leqslant$ 0,01 %). В противоположность этому 44 (из 47) явно туморогенные линии имели КОА выше 0,01 %, а 24 из этих линий обладали КОА выше 10 %. Как эти данные интерпретировать, зависит от критического подхода к линиям с неопределенным статусом. Если все неопределенные линии действительно трансформированы, то (как в случае клеточной линии крыс) умеренная или высокая КОА для линии клеток мышей может быть приемлемым показателем возможной туморогенности. Однако если линии определены как действительно нормальные, то не может быть значительного различия КОА нормальных и трансформированных линий клеток мышей. В то же время резонно заключить, что только трансформированные линии клеток мышей обладают очень высокой КОА, превышающей 25 %. Методологические артефакты столь значительны, что двух- или трехкратное отличие не может рассматриваться как существенное. Таким образом, доступные анализу данные не свидетельствуют о возможной корреляции КОА с туморогенностью у клеточной линии мышей.

Ситуация в клеточных линиях человека во многом аналогична (рис. 2). Коррелируют или не коррелируют туморогенность с КОА, полностью зависит от того, как рассматривать линии с неопределенным статусом. Можно спорить о том, что эти линии должны игнорироваться полностью. Однако, если эти линии в действительности игнорируются, тогда малочисленные данные, полученные для нормальных клеточных линий мыши и человека, не дают оснований для каких-либо заключений о возможной связи КОА с туморогенностью.

Рассматриваемые клетки были первично получены давно и адаптированы в течение длительного времени в условиях культивирования in vitro. Можно аргументировать, что утрата зависимости от субстрата возникла в условиях культивирования, что кажущаяся очевидной иногда наблюдаемая корреляция КОА и туморогенности

Рис. 2. Обобщение данных литературы о связи между туморогенностью in vivo и колониеобразующей активностью in vitro для установленных клеточных линий и для человеческих тканей или их первичных культур. Клеточные линии классифицированы как нормальные (*N*), туморогенные (*T*) или неопределенного статуса (*U*-I и *U*-II), как описано в рис. 1 и тексте. Ткани и первичные культуры не тестировались на туморогенность с помощью трансплантации in vivo, но были выделены непосредственно из нормальных тканей in vivo (*N*) и из опухолей (*T*). Иллюстративные данные представлены из следующих источников: Benedict et al., 1975; Courtenay et al., 1978; Freedman, Shin, 1974; Jones et al., 1975, 1976; Kahn, Shin, 1979; Kakunaga, Kamahora, 1968; Marshall et al., 1977; McAllister, Reed, 1968; Montagnier, Gruest, 1979; Stauer et al., 1977b; Von Hoff, Johnson, 1979.



случайна, а фенотипические признаки, характеризующие туморогенные клеточные линии в культуре,— не аналогичны таковым опухолевых клеток in vivo. Две линии с очевидностью указывают на то, что этот аргумент может быть обоснованным. В течение нескольких десятилетий известно, что большинство клеточных линий может приобретать способность не зависимого от субстрата роста в суспензионной культуре или в качестве интраперитонеальных асцитных суспензий только после длительной адаптации или селекции (Owens et al., 1953; Earle et al., 1954; Klein G., Klein E., 1956). О том, что этот эффект может распространяться на гелевые культуры, свидетельствует выраженная позитивная корреляция КОА и числа удвоений клеточных культур, что безоговорочно подтверждают данные (Giard et al., 1973). Другое доказательство было получено при исследовании КОА кусочков ткани и клеточных суспензий, приготовленных непосредственно из тканей in vivo без предварительного роста в культуре (McAllister, Reed, 1968; Courtenay et al., 1978; Von Hoff, Johnson, 1979). Сводка данных литературы по таким клеткам представлена на рис. 2. Из 10 нормальных тканей 7 были не способны к росту в мягком агаре. Оставшиеся три росли со 100 %-ной КОА, хотя были незлокачественными, но в другом отношении отличались от нормальных (McAllister, Reed, 1968). Из злокачественных тканей около половины были не способны расти в мягком агаре. Оставшиеся росли с различной эффективностью и некоторые из них обладали 100 %-ной КОА. Соотношение злокачественных тканей, не способных расти в мягком агаре, существенно и указывает на то, что in vivo опухолевые клетки значительно более зависимы от субстрата, чем трансформированные клетки, полученные из тканевых культур. Тем не менее, возможно, что умеренная или высокая КОА клеток, приготовленных из тканей in vivo, может быть достоверным индикатором,

если не злокачественного, то, по крайней мере, аномального состояния. Основной критерий этого обобщения — малочисленность данных, полученных для нормальных, непатологических тканей.

2.4.3. Зависимость от субстрата при циркулирующих метастазах

Значительная доля доказательств подчеркивает зависимость от субстрата суспендированных опухолевых клеток in vivo при циркулирующих метастазах. В 1915 г. Takahashi сообщил, что клетки карциномы мышей росли менее быстро при в/в введении, чем при п/к, и были не способны выжить в легочных сосудах. Эти наблюдения подтверждены и развиты Warren и Gates (1936) которые продемонстрировали, что успех метастазирования циркулирующих клеток карциномы крыс зависит от способности клеток «ускользнуть» из циркулирующей суспензии, а некроз опухолевых клеток более выражен внутрисосудисто, чем экстраваскулярно. Утрата способности прикрепления к приемлемому субстрату увеличивает смертность опухолевых клеток и уменьшает скорость их роста. Смертность наиболее высока, когда клетки впервые оказываются в суспензии. Значительная смертность клеток определяется в течение нескольких минут после того, как опухолевые клетки были суспендированы, а для многих опухолевых линий может достигать 100 % в течение 24 ч в циркулирующей суспензии in vivo (Fischer B., Fischer E., 1967; Fidler, 1970; Rein, Shin, 1978). Снижение жизнеспособности в суспензии не ограничено для опухолевых клеток, выделенных из солидных тканей, но может также в какой-то мере наблюдаться в опухолях, которые обычно растут в виде циркулирующих в сосудах суспензий (Hofer, 1969).

Действительно, термин «зависимость от субстрата» в общем использовался для указания на необходимость прикрепления клетки к стеклянному или пластиковому субстрату и был предпосылкой роста или выживаемости в культуре. Очевидно, что эти материалы неприменимы in vivo. Большинство клеток поддерживает свою жизнеспособность и пролиферативную активность без труда. В солидных тканях клеточные контакты с другими клетками или с биологическими поверхностями, такими, как основные мембраны или кость, способны выполнять это требование. Но в суспензии циркулирующих метастазов возможность для закрепления строго ограничена и может появиться при клеточной агрегации. В некоторых экспериментальных опухолевых системах частота появления метастазов слабо коррелирует как с числом единичных, неагрегированных опухолевых клеток, так и с их общим числом в циркуляторной системе, но сильно — с образованием внутрисосудистых агрегатов опухолевых клеток (Romsdahl et al., 1961; Garcia et al., 1963; Gershon et al., 1967; Kim, 1970; Crile et al., 1971; Salsbury et al., 1975). Когда единичные опухолевые клетки мышей ДВА были отделены от агрегатов опухолевых клеток, Watanabe (1954) обнаружил, что инокуляция агрегатов новым хозяевам была значительно эффективнее для формирования опухолей, чем единичных клеток. Watanabe предположил, что повы-

шенная туморогенность агрегатов может быть обусловлена лучшей выживаемостью опухолевых клеток в агрегатном состоянии. Fidler (1974) продемонстрировал, что метастазы меланомы В-16 мышей быстрее формируются преимущественно из больших гроздьев циркулирующих опухолевых клеток, чем из маленьких гроздьев единичных клеток. При сборе венозного оттока из фибросаркомы Т-241 мышей, имплантированной в бедренную мышцу хозяина, Liotta и соавт. (1976) смогли исследовать связь частоты метастазов и размера циркулирующих агрегатов опухолевых клеток. Было доказано, что частота метастазов — функция размера циркулирующих агрегатов. Тысяча опухолевых клеток в агрегатах по 6—7 клеток в каждом, например, вызывает в 10 раз больше метастазов, чем тысяча неагрегированных клеток, в то же время тысяча клеток в агрегатах по 10—12 клеток в каждом вызывает в 30 раз больше метастазов. Таким образом, агрегация опухолевых клеток значительно ускоряет успешное циркуляторное метастазирование в некоторых экспериментальных опухолевых системах in vivo.

Тенденция клеток к агрегации в культуре также тесно коррелирует во многих случаях с их метастазирующей способностью in vivo. В серии клеточных линий меланомы В-16 мыши, различающихся метастатической потенцией, более активно метастазирующие линии образовывали агрегаты быстрее и больше, по сравнению с менее активно метастазирующей линией (Nicolson et al., 1977). Метастазирующая способность линии В-16 тесно коррелировала как со скоростью гомологичной клеточной агрегации, так и со скоростью гетерологичной агрегации с тромбоцитами, лимфоцитами, эндотелиальными клетками легких и другими типами опухолевых клеток (Gasic et al., 1973; Fidler, 1975; Nicolson et al., 1977; Madyastha et al., 1978).

In vivo циркулирующие опухолевые клетки интенсивно агрегируют как одна с другой, так и с тромбоцитами (Wood, 1958; Gesic et al., 1973; Chew et al., 1976; Ambrus et al., 1978), лимфоцитами (Fidler, 1975; Chew et al., 1976) и эритроцитами (Chew et al., 1976). Агрегация с тромбоцитами происходит особенно быстро. При карциноме Уокера 100 % инокулированных клеток образуют агрегаты в течение 30 с после их введения в сосудистое русло (Chew et al., 1976). Инокуляция опухолевых и нормальных клеток при условиях, благоприятствующих гетерологичной агрегации, также стимулирует онкогенез. В/в коинокуляция нормальных фибробластов и асцитных клеток фибросаркомы МСА-6 мышей, например, увеличивает частоту экстраваскулярных метастазов до 1500 % (Gasic et al., 1973). Коинокуляция клеток HeLa с фибробластами мышей или человека может уменьшить минимальное количество инокулята, необходимого для образования опухоли, в тысячу раз у безволосых мышей (Stiles et al., 1976). Такое же усиление онкогенеза может быть получено с облученными или фиксированными глютаральдегидом и нормальными жизнеспособными фибробластами (Stiles et al., 1976).

Таким образом, несмотря на частое утверждение, что опухолевые клетки в культуре обладают сниженной способностью прикрепляться

к субстрату, опухолевые клетки in vivo строго зависимы от субстрата. Единичные опухолевые клетки в циркулирующей суспензии обладают высокой смертностью, которую можно снизить только за счет образования приемлемого прикрепления, в частности агрегации с другими циркулирующими клетками. Зависимость опухолевых клеток от субстрата может быть единственным наиболее важным барьером для успешного приживления циркулирующих метастазов.

2.4.4. Методологические трудности

Очевидная КОА клеточной линии может изменяться на несколько порядков в зависимости от критерия, используемого для оценки колониеобразования, состава суспензионного или жидкого геля, его концентрации, времени гелеобразования, размера инокулята, частоты смены культуральной среды, изменений осмотического давления в результате испарения, типа воды, используемой для приготовления растворов. Так как различные клеточные линии по-разному чувствительны к вариациям этих параметров, измеряемые значения КОА могут вводить в заблуждение до тех пор, пока метод не будет оптимизирован для каждой клеточной линии, а затем необходимо строго придерживаться оптимально индивидуализированного метода без вариаций.

2.4.4.1. Определяет ли КОА зависимость от субстрата?

В оригинальных исследованиях Burford и Sanders (1964), MacPherson и Montagnier (1964), в которых клетки ВНК дикого типа имели намного ниже КОА, чем номинально трансформированные клетки ВНК, использовали препараты неочищенного агара как суспензионную среду. Когда эксперименты были повторены с очищенной агарозой, клетки ВНК дикого типа обладали очень высокой КОА, которая в некоторых случаях достигала 50 % и значительно превышала КОА трансформированных вариантов в необработанном агаре (Montagnier, 1969; Maroudas, 1972). Неспособность клеток ВНК расти в неочищенном агаре, по-видимому, отражает присутствие растворимого ингибитора, который отсутствует в очищенной агарозе (Montagnier, 1969; Sanders, Smith, 1970). Таким образом, различие линии ВНК и ее трансформированных дериватов не отражает различие субстратной зависимости, а скорее дифференцированную чувствительность к растворимому ингибитору. Более того, мнимо нормальная линия ВНК в действительности — туморогенна (Defendi et al., 1963; MacPherson, 1963; Stoker, MacPherson, 1964; Schoental, 1967; Freedman, Shin, 1974; Berman, 1975; Kahn, Shin, 1979). Как следствие различие двух линий по их способности расти в неочищенном агаре отражает скорее видообразование, чем онкогенную трансформацию.

2.4.4.2. *Артефакты агрегации*

Пробы на КОА могут легко спутать зависимость от субстрата с клеточной адгезивностью. Из клеток большинства типов невозможно приготовить суспензию, состоящую полностью из единичных клеток. В связи с незавершенной диссоциацией или спонтанной агрегацией клеток следом за диссоциацией существует определенный фоновый уровень многоклеточных агрегатов. Этот уровень, являющийся результатом незавершенной диссоциации, обычно составляет 0,1—10 % общей клеточной популяции (Kakanuga, Kamahora, 1968; Mishra, Ryan, 1973; Skehan, Friedman, 1975; Wright et al., 1977; Carlsson, 1978).

Спонтанная агрегация, обусловленная клеточным столкновением, до затвердевания агара — высоко вариабельна, зависима от клеточной концентрации, геометрии сосуда, скорости перемешивания, продолжительности нахождения в суспензии перед пассированием и может вовлекать до 50 % всех клеток, и вызывать агрегаты до нескольких тысяч клеток (Skehan, Friedman, 1975; Wright, 1977; Carlsson, 1978). Фоновый уровень клеточных агрегатов часто того же порядка, что и число колоний, которые образуются в пробе на КОА (Kakanuga, Kamahora, 1968; Mishra, Ryan, 1973; Carlsson, 1978). В таких случаях возникает реальный вопрос: развиваются ли колонии из единичных субстратнонезависимых клеток или из агрегатов, клетки которых могут быть индивидуально зависимыми от субстрата. Клетки внутри агрегата могут прикрепляться одна к другой, если эта адгезия удовлетворяет их требованию к субстрату. Затем эти клетки способны пролиферировать в гелевых культурах и (даже больше) формировать многоклеточные колонии, которые не отражают субстратнонезависимый рост и представляют потенциально серьезный источник артефакта в пробах на КОА. Интересно, что Wringt и соав. (1977) продемонстрировали тесную корреляцию тенденции к спонтанной агрегации в суспензии и КОА в метилцеллюлозе для серии опытов, состоящей из 14 клеточных линий грызунов. Чтобы различать истинный субстратнозависимый рост единичных клеток-предшественников и субстратнозависимый рост агрегатов, фоновый подсчет числа колоний агрегатов, содержащих две или более клеток, должен быть сделан на день «0», т. е. немедленно после затвердевания агара, и вычислен из значений КОА, наблюдаемых к концу пробы. Такая поправка обычно не учитывалась.

2.4.4.3. *Критерий колониеобразования*

В идеальной пробе на КОА все клетки начинают как индивидуальные существа избегать контакта с другими клетками. Когда такая клетка делится и воспроизводит две дочерние, формируется колония. В принципе, любой агрегат, содержащий две или более клеток, должен рассматриваться как колония. Практически этот критерий почти никогда не использовался. Используемые критерии — произвольные и вариабельные. При этом как колонии рассматриваются только

те агрегаты, число клеток и диаметр которых превышают некоторые их минимальные значения. Критерии, предположенные в литературе, включают минимальное число клеток, колеблющееся от 4 до 100 (Dicke et al., 1971; Giard et al., 1973; Williams et al., 1973; Freedman, Shin, 1974; Jones et al., 1976; Aden, Knowles, 1977; Gallimore et al., 1977; Colburn et al., 1978; Barrett et al., 1979; Leong et al., 1979; San et al., 1979), и минимальный диаметр, колеблющийся от 0,1 до 1 мм (Mishra, Ryan, 1973; McFarland et al., 1975; Ishii et al., 1977; Marshall et al., 1977; Steuer et al., 1977, 1977b; Knowles, Franks, 1978; Tucker et al., 1978; Kahn, Shin, 1979; Tatsumi et al., 1979). Многие из этих критериев включают такие большие размеры агрегатов, что большинство колоний (часто очень значительного размера) исключалось из рассмотрения (Kakanuga, Kamahora, 1968; Mishra, Ryan, 1973; McFarland et al., 1975; Carlsson, 1978; Leong et al., 1979). Несомненная КОА, определенная таким образом, часто вызывает предубеждение: она не имеет выраженной связи с истинной колониеобразующей активностью.

Клетки, растущие как солидные ткани или колонии, обычно проявляют замедление роста, при котором размер популяции достигает верхнего лимитирующего значения (Weiss, 1967; Yahara, Edelman, 1972; McNutt, 1973). Истинный рост прекращается, когда достигается этот потолок. Каждый тип клеток имеет свой собственный верхний лимит, и этот лимит варьирует на несколько порядков в зависимости от типа клетки или ткани (Laird, 1969; Simpson-Herren, Lloyd, 1970; Steel, 1977). В единичной гелевой культуре объемы колоний широко варьируют, и даже слабые изменения, наблюдаемые в подсчете, могут привести к изменениям до двух порядков значений видимой КОА (Kakanuga, Kamahora, 1968). В сравнительных исследованиях адекватный критерий формирования колоний — то, что агрегаты, содержащие, по крайней мере, две клетки, рассматриваются как колонии. Любой другой критерий влечет за собой вероятность серьезного артефакта вследствие игнорирования большего процента маленьких колоний в одной клеточной линии по сравнению с другой. Многие видимые различия КОА, описанные в литературе для нормальных и туморогенных линий, почти определенно отражают скорее различия верхнего лимита размера колоний, чем действительной колониеобразующей активности.

2.4.4.4. Объем инокулята

Колониеобразующая активность чрезвычайно чувствительна к объему инокулята (Kakanuga и Kamahora, 1968; Dicke et al., 1971; Leavitt et al., 1977; Carlsson, 1978; Colburn et al., 1978; Knowles, Franks, 1978; Montagnier, Gruest, 1979).

Для большинства клеточных линий существует порог плотности инокуляции, ниже которого клеточная пролиферация и колониеобразование не происходят (Kakanuga, Kamahora, 1968; Dicke et al., 1971; Leavitt et al., 1977; Montagnier, Gruest, 1979). Выше этого порога пролиферация наблюдается, однако КОА непостоянна и изме-

няется в зависимости от объема инокулята. Наблюдаемая КОА может повышаться или понижаться на несколько порядков с увеличением плотности посева (Astrup, Permin, 1947; Kakanuga, Kamahora, 1968; Dicke et al., 1971; Aden, Knowles, 1977; Colburn et al., 1978; Knowles, Franks, 1978; Montagnier, Gruest, 1979). Порог плотности для колониеобразования не связан с максимальной КОА, на которую способна клеточная линия при оптимальных условиях. Две клеточные линии могут обладать идентичным порогом, но весьма различным максимумом КОА, или наоборот (Kakanuga, Kamahora, 1968; Montagnier, Gruest, 1979). Основные недостатки многих сравнительных исследований по изучению КОА — оптимизация условий пробы для каждой клеточной линии и принятие некоторого стандартного критерия измерения, такого, как размер плато КОА при сверхмаксимальной плотности посева. В пробах на КОА плотность инокуляции в чашках диаметром 50 или 60 мм в большинстве случаев произвольна и колеблется от 10 до 10 млн. клеток на чашку (Giard et al., 1973; Mishra, Ryan, 1973; Evans, Di Paolo, 1975; McFarland et al., 1975; Aden, Knowles, 1977; Gallimore et al., 1977; Marshall et al., 1977; Steuer et al., 1977b; Colburn et al., 1978; Knowles, Franks, 1978; Barrett et al., 1979; Kahn, Shin, 1979). Совершенно иная плотность посева часто использовалась в различных экспериментах и, в некоторых случаях, для клеточных линий в единичном исследовании (Freedman, Shin, 1974; Berman, 1975; McFarland et al., 1975; Aden, Knowles, 1977; Gallimore et al., 1977; Marshall et al., 1977; Steuer et al., 1977, 1977b; Hince, Roscoe, 1978; Barrett et al., 1979). Сравнительные данные в таких исследованиях не легко интерпретировать.

Зависимость КОА от плотности посева указывает на то, что на способность формировать колонии влияют кооперативные взаимодействия клеток (Colburn et al., 1978; Knowles, Franks, 1978; Barrett et al., 1978; Montagnier, Gruest, 1979). Негативная кооперация, при которой КОА падает с увеличением плотности посева, по-видимому, отражает артефакт голодания, возникающий вследствие повышенного истощения среды клеточным потреблением при высокой плотности. Этот эффект может быть преодолен увеличением концентрации питательных веществ и сыворотки (Montagnier, 1969; Taylor et al., 1975; Carlsson, 1978; Colburn et al., 1978; Barrett et al., 1979). Механизмы, ответственные за позитивную кооперацию, менее определены. Montagnier и Gruest (1979) предположили, что позитивная кооперация может быть результатом продукции лабильного, способного к распространению фактора роста. Альтернативным объяснением может быть то, что с повышением плотности посева увеличивается протяженность клеточной агрегации до затвердения агара в суспензии (Carlsson, 1978; Skehan, Friedman, 1975; Wright et al., 1977). С субстрат-зависимыми клетками повышенная агрегация может хорошо удовлетворять требованию клеток к субстрату внутри агрегата и, таким образом, приводить к увеличению КОА.

2.4.4.5. Артефакты при истощении среды

Для клеточного роста внешние питательные вещества и концентрации сыворотки должны быть равны или превышать специфические пороговые значения (Eagle, 1959; Eagle et al., 1961; Griffiths, 1970; Pledger et al., 1977). Когда используются маленькие объемы среды или редко осуществляется ее замена, клеточное потребление может уменьшить уровни содержания питательных веществ и сыворотки ниже порогов, необходимых для роста (Eagle et al., 1961; Griffiths, 1970; Holley, 1975). Снижение концентрации аминокислот на 10 % иногда достаточно для того, чтобы вызвать замедление роста (Griffiths, 1970). Хотя этот тип замедления роста наиболее выражен при высокой плотности популяции, он может наблюдаться в некоторых клеточных линиях в течение 24—48 ч после посадки даже при чрезвычайно низкой плотности (на порядок ниже значения, необходимого для сплошного монослоя) [Skehan, Friedman, 1978].

В монослойной культуре артефакты при истощении среды могут быть устранены перфузией (Kruse, 1963; Castor, 1968) или частой сменой среды (Griffiths, 1970; Westermak, 1971; Skehan, Friedman, 1976). В гелевых культурах слой агара занимает большую часть объема культурального сосуда и не может быть заменен, чтобы пополнить истощенную среду. Хотя небольшой объем среды может быть размещен на поверхности агара, в большинстве случаев этой среды недостаточно для того, чтобы предотвратить развитие артефактов истощения среды. Плотность посева может быть крайне низкой в пробах на КОА, тогда рост будет осуществляться в трех измерениях. В чашке диаметром 60 мм инокуляция 100 клеток со временем удвоения 24 ч приводит к развитию сплошного монослоя приблизительно в течение трех недель; 10 000 этих клеток достигнут того же уровня за 1 неделю, а 100 000 — за 3 дня. В пробах на КОА регистрируемые колонии обычно формируются за 1—4 недели после посадки (Kakanuga, Kamahora, 1968; Dicke et al., 1971; Giard et al., 1973; Mishra, Ryan, 1973; Weiss et al., 1973; Williams et al., 1973; Freedman, Shin, 1974; Berman, 1975; Evans, Di Paolo, 1975; McFarland et al., 1975; Jones et al., 1976; Gallimore et al., 1977; Marshall et al., 1977; Steuer et al., 1977, 1977b; Colburn et al., 1978; Knowles, Franks, 1978; Barrett et al., 1979; Kahn, Shin, 1979; Montagnier, Gruest, 1979; San et al., 1979).

В более чем половине литературных источников, по данным которых мы сравнивали КОА, указывается на то, что культуры не питались вовсе. Не было случая, где бы культуры питались 1 или 2 раза в день, как это обычно требуется для предотвращения развития артефактов при истощении среды (Skehan, Friedman, 1976, 1978).

Таким образом, неудачный или скудный рост клеток в мягком агаре может отражать чувствительность к сыворотке или питательным веществам как зависимость от субстрата. В самом деле, клетки ВНК, которые вначале рассматривались как неспособные расти в суспензии в мягком агаре, впоследствии давали высокие значения при определении их КОА в среде с добавлением экзогенных пуринов (Leavitt

et al., 1977; Montagnier, 1969; Taylor et al., 1975). Стимуляция клеточного роста в суспензии с повышенным содержанием питательных веществ и сыворотки была отмечена для других клеточных линий (Eagle, 1959; Eagle et al., 1961; Birch, Pirt, 1970; Higuchi, 1970; Tovey, Brouty-Boye, 1976; Yen et al., 1977). В отсутствие системы контрольных экспериментов, демонстрирующих избыток среды на протяжении исследования КОА, невозможно определить, является ли различие КОА двух клеточных линий результатом различия их зависимости от субстрата или чувствительности к истощению среды.

2.4.4.6. Содержание агара

Содержание агара в пробах на КОА варьирует существенно: от 0,25 до 0,5 % для верхнего суспензионного слоя и от 0,40 до 0,90 % для нижнего антиадгезивного слоя (Kakanuga, Kamahora, 1968; Williams et al., 1973; Freedman, Shin, 1974; McFarland et al., 1975; Gallimore et al., 1977; Ishii et al., 1977; Steuer et al., 1977, 1977b; Montagnier, Gruest, 1979). В общем, высокие концентрации агара задерживают рост и вызывают уменьшение эффективности колониеобразования. К примеру, увеличение концентрации агара от 0,25 до 0,275 % подавляет КОА эмбриональных клеток хомячка на 78 % в то же время увеличение концентрации до 0,40 % вызывает уменьшение КОА на 94 % (Kakanuga, Kamahora, 1968). Еще большее ингибирование КОА (на значение около трех порядков) наблюдали у линии лимфомы Беркитта, когда концентрацию агара увеличивали от 0,285 до 0,375 % (Montagnier, Gruest, 1979). В этих исследованиях подчеркивается, что данная клеточная линия может обладать почти любой желаемой КОА (в пределах нескольких порядков ее значений) при варьировании концентрации агара, плотности посева и критериев подсчета колоний.

2.4.4.7. Другие артефакты

Сообщалось о нескольких других факторах, влияющих на эффективность колониеобразования. Даже в хорошо увлажненных инкубаторах испарение может увеличить осмотическое давление среды и замедлить рост (Carlsson, 1978). Компенсация этого испарения давлением стерильной воды непосредственно в культуральной чашке может увеличить наблюдаемую КОА в 10 раз (Carlsson, 1978). Тип воды, используемой для приготовления ростовой среды и агара, также влияет на наблюдаемые значения КОА. Например, клетки человеческой лимфомы обладают в 11 раз большей КОА с деионизированной апирогенной водой, чем с деионизированной, облученной УФ, дистиллированной (Montagnier, Gruest, 1979).

2.4.5. Резюме

Если сравнительные исследования воспринимались по их номинальному значению, КОА не может рассматриваться как обоснованный индикатор туморогенности широкого спектра, хотя она может иметь предсказуемое значение для клеток определенных видов млеко-

питающих. Для клеточных линий крыс и хомячков низкая КОА не показательна при нормальном их статусе, однако доступные данные свидетельствуют о том, что высокая КОА ($\geqslant 10$ %) может быть индикатором возможной туморогенности. Для клеточных линий мышей и человека в настоящее время не может быть сделано каких-либо заключений о связи КОА и туморогенности, потому что для слишком многих клеточных линий нормальная или трансформированная природа клеток должным образом не установлена. Даже эти ограниченные выводы должны анализироваться с предосторожностью. Данные для клеточных линий с установленным нормальным статусом крайне ограничены, поэтому для клеточных линий крыс и хомячков очевидная корреляция высокой КОА и туморогенности не может рассматриваться как строго доказанная.

Однако сомнительно, может ли любая опубликованная работа по сравнительному изучению колониеобразующей активности быть воспринята, как она представлена. Настоящая техника выращивания является источником таких серьезных артефактов, что обнаруженная КОА клеточной линии может варьировать, по крайней мере, в несколько тысяч раз при относительно небольших изменениях в методике. Размер инокулята, состав агара, среды, схема питания и испарение — все может вызвать вариации значений наблюдаемой КОА на порядок или больше. Техника получения колоний не может уловить различий зависимого от субстрата роста и роста предшествующих агрегатов, дифференциальной чувствительности к растворимым ингибиторам, присутствующим в агаре, и дифференциальной чувствительности к голоданию в результате истощения питательных веществ и сыворотки. Наконец, критерии, используемые для оценки колониеобразования, в большинстве случаев полностью неадекватны и могут стать причиной серьезных артефактов в результате недооценки истинной КОА клеточных линий, формирующих маленькие колонии.

Вместе взятые методологические трудности настолько серьезны, что их необходимо учитывать в исследованиях. Однако нет ни единой опубликованной работы по изучению связи КОА и туморогенности, которая может заслуживать доверие.

2.5. АГГЛЮТИНАБЕЛЬНОСТЬ КОНКАНАВАЛИНОМ А (Кон А)

2.5.1. Предпосылка

Лектины — макромолекулы, которые обладают высоким связывающим сродством к углеводам. Кон А — растительный лектин из канавалии мечевидной, который связывает большое число сахаров и имеет особое высокое сродство с L-манно-D-глюкопиранозидами и с L-ацетил-D-глюкозидами (Poretz, Goldstein, 1970). В растворе Кон А образует многомерные молекулы, представленные идентичными субъединицами с молекулярной массой 27 кД. Основная форма при значениях pH выше 6,7 — тетрамерная, в то время как при более низких значениях pH преобладает димерная форма (Sharon, Lis, 1972). Кон А легко связывает углеводные остатки многих гли-

копротеинов и гликолипидов клеточной поверхности (Cline, Livingston, 1971; Ozanne, Sambrook, 1971; Cuatrecasas, 1973; Schmidt-Ullrich, Wallach, 1978). Он обладает выраженной биологической активностью, включая перераспределение клеточных поверхностных рецепторов (Nicolson, 1972; Yahara, Edelman, 1972), стимуляцию митоза (Smith, Goldman, 1972), ингибирование подвижности клеток (Friberg et al., 1972) и фагоцитоза (Berlin, 1972), ингибирование диссоциации монослоя несколькими протеазами (Brown, 1973), ингибирование выявления с помощью трипсина специфических классов клеточных поверхностных гликопротеинов (Brown, 1973) и агглютинацию различных типов клеток (Inbar, Sachs, 1969; Cline, Livingston, 1971; Moscona, 1971; Ozanne, Sambrook, 1971; Berlin, Ukena, 1972; Salzberg, Green, 1972; Rutishause, Sachs, 1975).

2.5.2. Корреляция с туморогенностью

Доказательство того, что увеличение агглютинабельности клеток Кон А может сопровождать трансформацию in vitro, было впервые представлено Inbar и Sachs (1969). Эти исследователи обнаружили, что пять различных нормальных клеточных популяций (селезенки мыши, костного мозга крысы и эмбриональных клеток хомячка, крысы и мыши) не агглютинировались Кон А. Две установленные линии (3T3 мыши и BS-C-1 обезьяны), которые, как предполагалось, являются нормальными, тоже были неагглютинабельными. В противоположность этому восемь клеточных линий мышей, хомячков и человека, инфицированных SV 40 или вирусом полиомы, значительно агглютинировались Кон А, так же как три лейкозные линии мышей и три линии хомячков, подвергнутые воздействию x-радиацией и химическими канцерогенами (Inbar, Sachs, 1969). Эти наблюдения были вскоре подтверждены несколькими лабораториями (Cline, Livingston, 1971; Eckhart et al., 1971; Ozanne, Sambrook, 1971) и были продемонстрированы в других системах культур, включая клетки ВНК и полиамавирус (Cline, Livingston, 1971; Ozanne, Sambrook, 1971; Noonan, Burger, 1973), куриные эмбриональные клетки и вирус саркомы Рауса (Burger, Martin, 1972), эмбриональные клетки хомячка и вирус саркомы Рауса с диметилнитрозамином (Shoham, Sachs, 1974). На основании данных исследований гипотеза о том, что агглютинабельность Кон А может быть коррелятом туморогенности, стала широко распространенной. Существовало общее предположение, что нормальные клетки были слабо агглютинабельны или неагглютинабельны вообще, однако злокачественно трансформированные клетки — высоко агглютинабельны.

Эти ранние исследования вызывают критические возражения. Используемая проба на агглютинацию была скорее субъективно визуальной, чем объективно количественной (Burter, Goldberg, 1967), и отражала больше эффекты второго порядка, чем истинную агглютинабельность (Oppenheimer, Odencrantz, 1972; Skehan, Friedman, 1975; Wright et al., 1977). Тесты на туморогенность in vivo не осуществлялись, поэтому нормальный или трансформированный статус используемых клеточных линий был в действительности неизвест-

ным. Почти во всех ранних исследованиях в качестве нормальных контрольных клеточных популяций изучали нормальные клетки или установленные линии клеток 3Т3 и ВНК. Клетки ВНК, как сейчас известно, являются туморогенными (Defendi et al., 1963; MacPherson, 1963; Stoker, MacPherson, 1964; Schoental, 1967; Freedman, Shin, 1974; Berman, 1975; Kahn, Shin, 1979), и интерпретация, основанная на их предполагаемом нормальном статусе, явно ошибочна. Хотя о клеточной линии 3Т3 нельзя с определенностью сказать, что она туморогенна, все же она почти наверняка аномальна (Boone et al., 1976). Выбор эмбриональных клеток в качестве нормального контрольного материала представляется логичным. Однако, недостаточная охарактеризованность этих клеток не позволяет делать какие-либо пространные или обобщающие заключения об агглютинабельности нормальных клеток.

В более недавних работах представлено несколько доказательств, которые поддерживают теорию, о том что трансформированные клетки более агглютинабельны Кон А по сравнению с нормальными клетками. Прежде всего нормальные клетки высоко вариабельны по агглютинабельности. В то время как некоторые не агглютинабельны, другие являются высоко агглютинабельными. Sivak, Wolman (1972) выявили, что две из пяти культур различных нормальных взрослых и эмбриональных тканей были существенно более агглютинабельны, чем клетки 3Т3. Три были идентичны по агглютинабельности Кон А клеткам SV-3Т3-прототипу предположительно трансформированных линий. Эти данные продемонстрировали недвусмысленно, что нормальные клетки могли быть высоко агглютинабельны, и навели на мысль, что мышиные клетки 3Т3 не могут быть образцом большинства нормальных клеток в агглютинабельности Кон А. Высокая степень агглютинабельности Кон А в настоящее время показана для ряда нормальных клеток, включая куриные эмбриональные клетки (Moscona, 1971), клетки, инфицированные неонкогенными вирусами (Zarling, Tevethia, 1971; Poste, Reeve, 1972), лейкоциты (Berlin, Ukena, 1972), эпителиальные клетки кишечника эмбриона человека (Weiser, 1972), ряд человеческих лимфобластоидных линий (Glimelius et al., 1975), эмбриона хомячка, тимус и печень новорожденных животных и лимфоузлы отъемышей (Berman, 1975), мышиные эмбриональные клетки (Marciant et al., 1976) и ряд линий клеток печени взрослых крыс (San et al., 1979; Shimada et al., 1979).

Подобно нормальным клеткам туморогенные линии также значительно варьируют по своей агглютинабельности Кон А. Некоторые агглютинируются легко, но многие, как показано сейчас, слабо или не агглютинируются вообще. Туморогенные линии с низкой агглютинабельностью Кон А включают клетки ВНК (Cline, Livingston, 1971; Ozanne, Sambrook, 1971; Berman, 1975) и определенные их дериваты, инфицированные аденовирусами (Meager et al., 1978), хомячковые клетки НТ-1 (Salzberg, Green, 1972), некоторые спонтанно трансформированные клоны 3Т3 (Grimes, 1974), мышиные клетки 3Т12 и трансформированные вирусом саркомы мышей KMSV (Van Nest, Grimes, 1974), несколько мышиных лимфом (Rutishauser,

Sachs, 1975), мышиные клетки L и их гибриды с клетками печени крыс (Marciani et al., 1976) и множество крысиных гепатом (San et al., 1979; Shimada et al., 1979). В дополнение, клетки, эксплантированные из мышиных сосудообразующих сарком, человеческих миелом и лимфом и карциномы молочной железы мышей, слабо агглютинабельны Кон А. Таким образом, слабая агглютинабельность Кон А не показательна для нормального статуса, так же как и высокая агглютинабельность не указывает на туморогенность.

В экспериментах по исследованию агглютинабельности родственных клонов, сублиний или тканевых серий случайно наблюдалась корреляция между туморогенностью in vivo и агглютинабельностью Кон А. Общая, хотя и не неизменная тенденция повышенной агглютинабельности наблюдалась для туморогенных сублиний клеток 3Т3 (Grimes, 1974; Van Nest, Grimes, 1974) и для туморогенных линий клеток почек мышей, индуцированных SV40 (Kurimura, Hirano, 1972). В большинстве случаев, однако, туморогенность и агглютинабельность Кон А не связаны. Утрата корреляции между двумя признаками сообщалась для мышиных клеток 3Т3 и их дериватов, инфицированных вирусом мышиной саркомы (Nomura et al., 1974), нескольких сублиний ВНК (Berman, 1975), более чем 20 человеческих лимфоцитарных, лимфобластоидных линий, лейкозных, лимфомных и миеломных клеток (Glimelius et al., 1975), серии гибридов мышиных клеток L929 и крысиной гепатомы (Marciani et al., 1976), сублиний ВНК, инфицированных аденовирусами (Meager, 1978), и более чем дюжины линий крысиной печени (San et al., 1979; Shimada et al., 1979).

2.5.3. Методологические трудности

2.5.3.1. Артефакты токсичности

Кон А, так же как большинство лектинов, высоко токсичен для многих клеток (Shoham et al., 1970; Ozanne, Sambrook, 1971; Culp, Black, 1972) и может вызывать артефакты в пробе на агглютинацию путем литического освобождения ДНК, которая сама по себе является эффективным агглютинином, запуска процесса высвобождения расщепляющих ферментов (таких, как протеазы, липазы и гликозидазы, способных модифицировать клеточную поверхность и, следовательно, нарушать агглютинабельность), интерференции с синтезом новых рецепторов к Кон А, их встраиванием в плазматическую мембрану с последующим эндоцитозом или сбрасыванием в окружающую среду.

Диссоциация клеток в единичные клеточные суспензии — предпосылка для измерения агглютинабельности. Химические и энзиматические диссоциирующие агенты, используемые для этой цели, модифицируют свойства клеточной поверхности, включая агглютинабельность, и проявляют значительную токсичность ко многим типам клеток, нарушая их жизнеспособность и вызывая явный лизис (Owens et al., 1953; Skehan, Friedman, 1975; McKeehan, 1977; Smets et al., 1979). Эти агенты могут вызывать при измерениях агглютинации те же артефакты, которые обсуждались в предыдущем параграфе.

2.5.3.2. Артефакты агглютинации

Агглютинация лектинами является флокулирующим процессом, при котором многоклеточные агрегаты сформированы в результате перекрестного связывания лектином. Процесс начинается, когда две единичные клетки становятся перекрестно связанными в форме клеточной пары или дублета. Начальная скорость агглютинации в хорошо перемешанной однородной суспензии — функция первоначальной концентрации частиц, скорости перемешивания, размера, формы и плотности индивидуальных клеток и присущей их поверхностям агглютинабельности. В то время как агглютинация происходит, природа процесса изменяется фундаментально. Развивается целая серия эффектов второго порядка, которые ничего не имеют общего с присущей агглютинабельностью per se, но которые могут глубоко повлиять на самые ранние фазы агглютинационного процесса.

Если однажды клеточные дублеты сформировались в агглютинирующей суспензии, в дальнейшем агглютинация будет результатом не только формирования пар при столкновении синглетов, но также результатом формирования больших агрегатов, таких, как триплеты и квадриплеты. В то время как большие агрегаты сформированы, тотальная концентрация частиц будет уменьшаться, тогда как размер агрегатов и перекрестное столкновение будут увеличиваться. Постепенно формируется многодисперсный коллоид, который содержит агрегаты различных размеров, колеблющихся от единичных клеток до агрегатов, содержащих миллионы клеток. В течение начальных стадий агглютинации многоклеточные агрегаты будут формироваться почти исключительно за счет дублетов. В этих условиях либо исчезновение синглетов, либо появление многоклеточных (преимущественно) дублетов обеспечивает точный индекс агглютинационного процесса. После начальной стадии этого процесса вклад синглетов прогрессивно уменьшается, а агрегатов — увеличивается. Концентрация синглетов заметно не изменяется, в то время как агглютинация развивается, и число агрегатов может действительно уменьшаться. К примеру, два кластера из 10 клеток сливаются, чтобы сформировать один кластер из 20 клеток. При этих условиях исчезновение синглетов несущественно для измерения степени агглютинации, в то время как число многоклеточных агрегатов в действительности не отражает истинного агглютинационного процесса.

Единичные индивидуальные клетки в суспензии умеренно однородны по размерам, форме и массе. Гантелевидной формы дублеты составляют субпопуляцию также умеренно однородную. Сверх дуплетного размера, однако, эта однородность утрачивается. Клеточные триплеты, например, могут геометрически располагаться в двух различных конфигурациях: конец в конец в цепи из трех клеток в ряд или треугольным порядком. Большие агрегаты из нескольких дюжин клеток могут принимать сбивающий с толку ряд геометрических конфигураций. Более того, клетки в таком агрегате могут быть либо свободно, либо тесно упакованы. Общая геометрия любого наименьшего агрегата гипервариабельна: с чрезвычайно беспорядочными

пучками, цепями, сфероидами и петлями — все перемешано. Таким образом, два агрегата с идентичным числом клеток будут обычно существенно отличаться по форме, поверхностной области, по поверхностной неровности, сечению перекрестного столкновения, центру ротации, ротационной скорости в перемешиваемой среде и способности пассивного отделения или высвобождения других клеток или агрегатов неагглютинационным механизмом. Различия степени проявления этих параметров вторичного порядка в свою очередь подтверждают широкую вариабельность скорости движения агрегатов в сосуде для перемешивания. Изменения в любой из этих характеристик будут нарушать кинетику агглютинации таким способом, что затмевают истинную агглютинабельность клеточной поверхности.

В многодисперсных коллоидах агрегаты широко различаются своими характеристиками, а классы агрегатов различного размера обычно отделяются один от другого пространственно. Таким образом, не только общая концентрация частиц широко варьирует в различных частях сосуда, но подобным образом изменяются частота появления и размер различных классов агрегатов, так же как локальная скорость агрегации или агглютинации. Измерения агглютинации в слабо различающихся по значениям местах сосуда для перемешивания могут, следовательно, дать фундаментально различные картины скорости и степени агглютинационного процесса (Skehan, Friedman, 1975; Wright et al., 1977). Когда два различных типа клеток сравнивались по их способности агглютинировать или агрегировать, небольшие различия в их размере и форме, плотности или предпочитаемой геометрии агрегации могут создавать громадные различия соответственно в их скорости и степени агглютинации, которая не имеет ничего общего с присущей агглютинабельностью и которая полностью опосредована вторичными эффектами. Эти артефакты являются основным источником ошибки в сравнительных исследованиях агглютинации лектином.

Агглютинабельность лектином может быть точно замерена только тремя путями. Первый — измерение начальной скорости агглютинационного процесса в условиях, когда могут существовать только синглеты и дублеты. Этот метод идентичен таковому для начальных измерений скорости в кинетике энзимов; в самом начале процесса реакции концентрация реактивов (синглетов) и продуктов (дублетов) приблизительно постоянна, а вторичные эффекты незначительны. К сожалению, использование метода начальной скорости является редким при исследовании агглютинации (Maca, Hoak, 1974; Vlodavsky, Sachs, 1975; Linnemans et al., 1976). Второй метод, который уместен только при обстоятельствах, где вторичные эффекты достаточно малы, чтобы ими пренебречь,— определение уровня равновесия агглютинации, при котором агрегационные и диссоциирующие силы сбалансированы, а степень агглютинации достигла неизменяемого уровня плато. Этот метод использовался весьма редко. В общем, или плотность клеток была слишком высокой, чтобы можно было избежать вторичных эффектов (Burger, Goldberg, 1967; Furmanski et al., 1972; Oppenheimer, Odencrantz, 1972; Deman,

Bruyneel, 1973; Gordon, Marquardt, 1974; Hwang et al., 1974; Maca, Hoak, 1974; Kaneko et al., 1975; Rutishauser, Sachs, 1975; Vlodavsky, Sachs, 1975; Davis et al., 1976; Marciam et al., 1976), или кинетика определялась так, что уровень плато нельзя было установить (Burger, Goldberg, 1967; Furmanski et al., 1972; Rittenhouse, Fox, 1974; Rutishauser, Sachs, 1975; Davis et al., 1976), или кинетика не могла достичь стабильного плато (Burger, Goldberg, 1967; Furmanski et al., 1972; Oppenheimer, Odencrantz, 1972; Deman, Bruyneel, 1973; Hwang et al., 1974; Rittenhouse, Fox, 1974; Kaneko et al., 1975; Rutishauser, Sachs, 1975; Vlodavsky, Sachs, 1975; Davis et al., 1976; Marciani et al., 1976). Определенные (Linnemans et al., 1976) агглютинационные кривые удовлетворяют необходимым требованиям. В дальнейшем метод соотношения агрегатов уместен для сравнительных исследований агглютинабельности лектином, если он оптимизирован для каждой клеточной линии при условии, что сравниваемые клетки не различаются значительно по форме, плотности, размеру или пространственному распределению в сосуде для перемешивания (Skehan, Friedman, 1975; Wright et al., 1977). Третий метод, несомненно наиболее достоверный для сравнительных исследований, включает измерения либо начальной скорости, либо уровня плато связывания клеточной суспензии с предсуществующим монослоем. Несколько вариантов клеточно-монослойной техники было опубликовано, хотя ни один из них еще не использовался, чтобы исследовать начальную скорость или уровень плато связывания (Furmanski et al., 1972; Rittenhouse, Fox, 1974; Rottman et al., 1974; Rutishauser, Sachs, 1975; Marciani et al., 1976).

В общем эти методики не использовались, чтобы исследовать взаимосвязь агглютинабельности Кон А с туморогенностью. Вместо этого большинство таких исследований проведено с использованием метода Burger — Goldberg, при котором клеточная суспензия определялась и оценивалась значениями 0, +, ++, +++, или ++++ соответственно ее субъективно ощущаемой степени агглютинации (Burger, Goldberg, 1967). Метод — чисто субъективный, игнорирует неслучайное распределение клеток в реакционном сосуде. Он проводился в избыточно высоких клеточных концентрациях и при условиях, в которых измерение вторичных эффектов почти исключительно ведет к различным и несовместимым ошибкам у независимых исследователей, рассматривавших идентичный образец, не улавливает различий между числом и размером агрегатов, которые являются крайне различными отражениями агглютинационного процесса, не определяет либо начальную скорость, либо значения плато. Сомнительно, чтобы этот метод имел какую-либо ценность в сравнительных исследованиях с вовлечением множественных клеточных типов.

2.5.4. Резюме

Если доступные данные принимаются в истинном их значении, то корреляция агглютинабельности Кон А с туморогенностью не существует. Так, отдельные группы нормальных и неопластических кле-

ток широко варьируют по агглютинабельности Кон А, и каких-либо стойких различий между ними в этом аспекте показать не удалось. В ранних работах исходили из того, что предполагаемая трансформация первично индуцируется инфицированием клеток потенциально онкогенными вирусами. Инфицирование нормальных или неопластических клеток онкогенными и неонкогенными вирусами обычно увеличивало агглютинабельность Кон А. Этот эффект, следовательно, является результатом вирусной инфекции скорее, чем онкогенной трансформации, и подчеркивает несоответствие инфицирования клеток онкогенными вирусами как общей модели для онкогенной трансформации. Однако методы, которые использовались в изучении корреляции между агглютинабельностью и туморогенностью, являются источником серьезных артефактов в определении скорее вторичных эффектов, чем истинной агглютинабельности. Возможность интерпретации таких данных вызывает сомнение. Таким образом, на основании имеющихся сведений было бы неразумно делать какие-либо заключения о связи клеточной туморогенности со способностью к агглютинации Кон А.

2.6. АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА

2.6.1. Предпосылка

Известно уже более полувека, что определенные типы злокачественных опухолей обладают повышенной способностью к энзиматическому лизированию внеклеточных фибриновых сгустков (Fischer, 1925). По крайней мере, два различных класса энзимов ответственны за этот фибринолиз (Cliffton, Grossi, 1955; Albrechtsen, 1957; Christman, Acs, 1974; Quigley et al., 1974). Первый представлен активаторами плазминогена, в то время как другой включает протеолитические энзимы, которые действуют независимо от плазминогена.

Активаторы плазминогена — гетерогенный класс энзимов, который включает урокиназу, сыворотку и тканевые формы in vivo и ряд форм, продуцируемых клеточными культурами in vitro (Astrup, Permin, 1947; William, 1951; Christman, Acs, 1974; Strickland et al., 1976). Активатор плазминогена вызывает лизис фибрина в два этапа. Вначале активатор плазминогена обращает неактивный проэнзим плазминоген в активный энзим — плазмин (Robbins et al., 1967; Unkeles et al., 1974). Затем активированный плазмин расщепляет белковый субстрат, такой, как фибрин. Активатор плазминогена, продуцируемый куриными эмбриональными фибробластами, инфицированными вирусом саркомы Рауса, гидролизует единственную аргининвалиновую связь в молекуле плазминогена. При этом образуется активный плазмин, состоящий из двух полипептидных цепей с различной молекулярной массой (Robbins et al., 1967; Quigley et al., 1974; Unkeless et al., 1974). Внутриклеточный активатор плазминогена седиментируется вместе с ядрами и, вероятно, является интегральным мембранным белком (Unkeless et al., 1974; Jaken, Black, 1979). Некоторые клетки способны секретировать активатор

плазминогена во внеклеточную среду. Механизм этой секреции неизвестен, но может вовлекать транслокацию энзима в плазматическую мембрану экзоцитозом, а затем с помощью молекулярного сбрасывания во внеклеточную среду (Jaken, Black, 1979).

Фибринолитическая активность клеточной культуры или ткани измерялась по способности разрушать внеклеточный фибрин. Две, наиболее обычно используемые пробы заключаются в формировании путем лизиса чистой бляшки в фибриновой пленке и разрушении меченного ^{125}I фибрина (Astrup, Mullerty, 1952; Unkeless et al., 1973). Уровни активатора плазминогена обычно измеряются как плазминоген-зависимое расщепление протеинового субстрата, такого, как фибрин, казеин или протамин (Astrup, Mullerty, 1952; Goldberg, 1974; Unkeless et al., 1974; Kessner, Troll, 1976), хотя недавно прямая флюоресцентная проба стала также доступна (Zimmerman et al., 1978). Так как клетки продуцируют ряд протеолитических энзимов, отличных от плазмина, многие из которых могут также расщеплять фибрин, различие между активаторами плазминогена и другими типами фибринолитической активности является важным. Активаторы плазминогена отличаются по их абсолютному требованию — присутствию плазминогена. Так как многие ткани способны одновременно продуцировать активатор плазминогена и плазминоген-независимые фибринолитические энзимы (Cliffton, Jrossi, 1955; Albrechtsen, 1957), важно определить, какая часть общей фибринолитической активности зависит от плазминогена, а какая — нет.

2.6.2. Корреляция с туморогенностью

Интерес к возможной связи малигнизации с увеличенной продукцией активатора плазминогена оживился в начале 70-х годов после исследований Reich и его коллег по трансформации клеточных культур потенциально онкогенными вирусами. Мышиные 3Т3 и куриные, мышиные и хомячковые эмбриональные клетки в культуре — все, как было выявлено, секретируют очень низкие уровни энзимов, ответственных за фибринолитическую активность (ФА), в культуральную среду. Инфицирование этих клеток рядом потенциально онкогенных вирусов вызывало стимуляцию секреции энзимов ФА от 5 до 45 раз, в то время как инфицирование нетрансформирующими штаммами птичьих лейкозных вирусов или неонкогенными цитопатогенными РНК- или ДНК-содержащими вирусами не влияло на секрецию энзимов ФА (Ossovski et al., 1973; Unkeless et al., 1973). Из этих наблюдений возникло предположение, что стимуляция фибринолитической активности тесно коррелировала с трансформацией. Активатор плазминогена, как было последовательно показано, почти полностью ответствен за увеличенную фибринолитическую активность куриных эмбриональных клеток, инфицированных вирусом саркомы Рауса, множества туморогенных эпителиальных линий печени крыс, ряда химически и вирус-трансформированных мышиных линий, химически индуцированных крысиных глиом и мышиных кле-

ток 3Т6 (Quigley et al., 1974; Unkeless et al., 1974; Montesano et al., 1977; Rifkin, Pollack, 1977; Hince, Roscoe, 1978; Jaken, Black, 1979).

Таким образом, они развили временну́ю версию гипотезы Fischer (Fischer, 1925) о том, что нормальные клетки обладают малой способностью к фибринолизу, в то время как онкогенная трансформация сопровождалась существенным увеличением фибринолитической активности по результатам преимущественно увеличенной секреции активатора плазминогена (Reich, 1974).

Хотя ранние работы, казалось, поддерживают эту теорию, более недавние исследования внесли значительные сомнения в ее обоснованность. Наиболее серьезные возражения: отсутствие стойкой связи между туморогенностью и продукцией энзимов ФА тканевыми фрагментами и первичными культурами, приготовленными из тканей in vivo; нормальный или онкогенный статус клеточных линий, использованных в ранних экспериментах, скорее предполагался, чем устанавливался пробами in vivo; клональная вариабельность и плотностная зависимость игнорировались в большинстве сравнительных исследований; многие нормальные ткани обладают высокими уровнями энзимов ФА и активатора плазминогена.

Гипотеза Reich—Fischer опровергается рядом исследований по изучению продукции активатора плазминогена тканевыми фрагментами и первичными культурами, приготовленными из тканей in vivo. При исследовании более чем 200 человеческих опухолей и нормальных тканей Cliffton и Grossi (1955) наблюдали, что нормальные ткани, как правило, продуцировали высокие уровни фибринолитической активности, в то время как продукция опухолями была вариабельной. Эксплантаты опухолей молочной железы составляли группу, продуцирующую незначительное количество ген-независимого энзима ФА, но умеренные — активатора плазминогена. Большинство плоскоклеточных карцином не продуцировало ни активатор плазминогена, ни плазминоген-независимый энзим ФА (ПНФА). Аденокарциномы пищеварительного тракта были высоко вариабельны в продукции, только при больших карциномах кишечника наблюдалась тенденция к продуцированию большого количества ПНФА. Саркомы обладали обычно высоким уровнем ПНФА (Cliffton, Grossi, 1955).

Заключения Cliffton и Grossi были подтверждены несколькими лабораториями. Albrechtsen (1957) выявил, что продукция активатора плазминогена нормальными человеческими тканями варьировала широко, колеблясь от нуля (печень) до низкого (селезенка, яички, головной мозг, сердце), умеренного (мышца, почки, гипофиз, яичник, легкие) и высокого (щитовидная железа, предстательная железа, лимфоузел, надпочечник, матка) уровней. Bernick, Kwaan (1969) сообщили об идентичных данных для первичных культур, приготовленных из нормальной почки, легкого, мочевого пузыря, уретры и почечных кровяных сосудов. Таким образом, ясно, что в противоречии с гипотезой Reich — Fischer большинство нормальных тканей продуцирует умеренное или большое количество энзимов ФА или активатора плазминогена.

Pearlstein и соавт. (1976) сравнили фибринолитическую активность множества туморогенных мышиных, крысиных, хомячковых и человеческих линий с первичными культурами клеток, приготовленными из нормальных тканей нескольких видов млекопитающих. Значения фибринолитической активности нормальных клеточных культур варьировали в пределах более чем одного порядка. Особенно высокая фибринолитическая активность наблюдалась в клетках простаты человека и мочевого пузыря теленка. Карциномы проявляли низкую или умеренную ФА и как группа были идентичны нормальным первичным культурам. Саркомы как группа имели средний уровень ФА несколько выше, чем нормальные первичные культуры, но отклонения в обеих группах были достаточно велики, хотя разница не была статистически достоверной. Сравнимые данные были получены Wilson и Dowdle (1977), исследовавшими продукцию активатора плазминогена первичными клеточными культурами, выделенными из многих человеческих тканей. Значения количества продуцируемого нормальными тканями активатора колебались в пределах свыше нескольких порядков (от неопределяемых до очень высоких уровней). Культуры, полученные из 6 незлокачественных и 41 злокачественной опухоли, продуцировали в среднем около половины количества активатора плазминогена нормальных культур, но стандартные отклонения для трех групп тканей были достаточно высоки (150—460 % их значения), хотя видимые различия между группами не были статистически достоверными. В тканях головного мозга и в эпителиальных тканях не было корреляции между продукцией активатора плазминогена и туморогенностью, в то время как мезенхимальные ткани злокачественных опухолей секретировали его больше, чем доброкачественные опухоли или нормальные фибробласты, но такая тенденция была слабо выражена и был отмечен ряд исключений.

Вопреки гипотезе Reich — Fischer нормальные ткани часто выявляют высокие уровни фибринолитической активности. Тканевые фрагменты или первичные культуры человеческой мышцы, почки, гипофиза, яичника, легкого и мочевого пузыря — все секретируют умеренное количество активатора плазминогена, в то время как щитовидная железа, простата, уретра, лимфоузел, надпочечник и ткани матки — продуцируют его высокие уровни (Albrechtsen, 1957; Bernick, Kwaan, 1969). Из большой серии нормальных человеческих тканей только печень не продуцировала активатор плазминогена (Albrechtsen, 1957). Подобные результаты сообщались для первичных культур, приготовленных из нормальных тканей нескольких других видов млекопитающих (Pearlstein et al., 1976; Laug, 1979).

Продукция активатора плазминогена, в частности, особенно выражена в тканях, подвергающихся регенерации или миграции. Особенно высокие уровни продуцировались в течение периода инвазии мышиного трофобласта (Strickland et al., 1976), миграции перитонеального макрофага (Vassalii et al., 1976), дифференциации перитонеальной эндодермы внутренних клеточных масс (Strickland et al., 1976), инволюции молочной железы (Ossowski et al., 1979) и овуляции у крыс (Beers et al., 1975; Strickland, Beers, 1976). Таким обра-

зом, высокие уровни активатора плазминогена обычно ассоциируются с множеством процессов в нормальных тканях: развитием, регенерацией и миграцией.

Ранние исследования фибринолиза клеточными культурами допускали без проверки, что клетки, подверженные воздействию канцерогенных агентов, были онкогенно трансформированными. Как мы отмечали ранее, это допущение недействительно. Хотя онкогенные вирусы и канцерогены вызывают множество биологических эффектов, многие из которых не имеют отношения к их онкогенности, возникает вопрос, связана ли причинно их стимуляция фибринолиза со злокачественной трансформацией или различные механизмы ответственны за стимуляцию ФА и трансформацию. Недавние исследования, в которых клеточные линии одновременно тестировались на туморогенность in vivo и ФА, обеспечивают слабую поддержку гипотезы Reich — Fischer и предполагают, что два эффекта, вероятно, различны и не связаны единым механизмом.

Приемлемо хорошую корреляцию между ФА и туморогенностью in vivo отмечали Jones и соавт. (1975) для человеческой линии TE85 и множества инфицированных вирусом сублиний. Хотя линия TE85 стойко не вызывает опухолей во множестве проб in vivo, она была первоначально выделена из человеческой остеосаркомы (Jones et al., 1975; Howett et al., 1978). Подобные данные были сообщены Howett (1978) для хомячковых эмбриональных клеток и вирусных трансформантов, инфицированных вирусом герпеса простого, цитомегаловирусом и гибридом аденовируса и SV 40 (PARA-7). Нетуморогенные родительские линии не продуцировали активатор плазминогена, в то время как 6 или 7 туморогенных трансформантов секретировали высокие уровни энзима. Только трансформант PARA-7 не выявлял активность фермента. В ряде исследований сообщалось о противоположных данных. Gallimore и соавт. (1977) обнаружили, что 5 туморогенных сублиний крысиных эмбриональных клеток, инфицированных аденовирусом, обладали повышенными уровнями фибринолитической активности, так же как и нетуморогенные линии, инфицированные аденовирусом.

Pollack и Rifkin (1977) сообщили о подобных данных для дериватов мышиных клеток 3T3, инфицированных SV 40 и SV 101. Хотя две туморогенные вирус-инфицированные линии имели повышенные уровни активатора плазминогена, две нетуморогенные инфицированные линии не обладали подобной активностью энзима. В самом деле, нетуморогенные инфицированные линии имели более высокий средний уровень секреции активатора плазминогена по сравнению с туморогенными линиями. В сериях из двух нетуморогенных мышиных линий и 8 туморогенных вирус-трансформированных 7 туморогенных сублиний обладали более низкими уровнями активатора плазминогена по сравнению с наиболее продуцирующими энзим нетуморогенными линиями (Rifkin, Pollack, 1977). Данные о том, что туморогенные и нетуморогенные вирус-инфицированные линии имеют сходную степень индукции фибринолитической активности, позволяют предположить: стимуляция фибринолиза вирусом

не является причиной онкогенной трансформации, а два эффекта обусловлены различными клеточными реакциями, вызванными различными механизмами действия вируса.

Литературные сообщения о связи фибринолиза со спонтанной, химической и радиационной трансформацией in vitro также не поддерживают гипотезу Reich — Fischer. Существенное увеличение фибринолиза отмечалось для двух человеческих линий, трансформированных уретаном (Benedict et al., 1975), и пяти линий крысиной глиомы, индуцированной этилнитрозомочевиной (Hince, Roscoe, 1978). Три из четырех мышиных химически индуцированных туморогенных линий, происходящих из C3H/10T$\frac{1}{2}$/C18, также проявляли повышенную ФА, а одна — пониженную. Однако, нормальный статус «контроля» C3H/10T$\frac{1}{2}$/C18 сомнителен, поскольку эта линия, хотя и нетуморогенна при инокуляции суспензии единичных клеток, вызывает опухоли в пробе.

Шесть из тринадцати туморогенных хомячковых линий, как сообщили Barrett и соавт., (1979, обладали повышенным уровнем фибринолиза после обработки бенз(а)пиреном, в то время как оставшиеся семь не проявляли значительной стимуляции. Полную утрату корреляции между туморогенностью и фибринолитической активностью продемонстрировали Montesano и соавт. (1977) для шести нетуморогенных эпителиальных линий печени крыс и десяти туморогенных сублиний. В этом эксперименте продемонстрировано как уменьшение, так и увеличение ФА вслед за трансформацией. Подобное наблюдение отмечено (Shimada et al., 1979) для тринадцати линий печени и гепатом крыс. Наконец, трансформированные радиацией дериваты эмбриональных клеток мышей BALB/c выявили уменьшение секреции активатора плазминогена (Rifkin, Pollack, 1977). Таким образом, доступная литература не может подтвердить любую стойкую связь между онкогенной трансформацией in vitro и изменениями, фибринолитической активности в общем или активатора плазминогена специфически.

2.6.3. Методологические трудности

Несколько артефактов осложняют изучение корреляции фибринолиза с туморогенностью. Наиболее важные из них включают различия между внутри- и внеклеточным уровнями ФА, плотностной зависимостью и клональной вариабельностью ФА.

В большинстве исследований фибринолиза проводилось измерение ФА энзима, секретируемого во внеклеточную среду. Однако, многие клетки, секретирующие энзимы ФА, также обладают часто сравнимой внутриклеточной активностью, которая в некоторых случаях превышает уровни внеклеточной (Romsdahl et al., 1961; Unkeless et al., 1974; Benedict et al., 1975; Jones et al., 1976; Rifkin, Pollack, 1977; Jaken, Black, 1979; Laug, 1979). Изредка клетки с высоким уровнем внутриклеточной ФА не секретируют энзимы, опре-

деляющие ФА (Jaken, Black, 1979). Функция опухолевой ФА неизвестна, поэтому не ясно, важны ли оба компонента — внутри- и внеклеточный — или какой-то один из них. Таким образом, сравнительные исследования, в которых производилось измерение только внеклеточного фибринолиза, должны быть интерпретированы с некоторой предосторожностью.

Подобно множеству других клеточных процессов фибринолиз и продукция активатора плазминогена зависят от плотности клеток (Romsdahl et al., 1961; Jaken, Black, 1979; Laug, 1979). В хомячковой системе клеток меланомы B4 продукция активатора плазминогена не начиналась до тех пор, пока не достигался максимум плотности популяции (Romsdahl et al., 1916), в то время как в эндотелиальных клетках аорты теленка наблюдалось прогрессирующее увеличение продукции с увеличением плотности (Laug, 1979). Таким образом, сравнительное изучение видимого различия ФА между двумя линиями может отражать дифференциальную чувствительность регуляции с помощью зависимых от плотности клеточных взаимодействий или разницу в скорости роста, что создает неодинаковые плотности популяций ко времени измерения ФА скорее, чем истинное различие в природной способности для фибринолиза при специфичной плотности.

Наконец, клональная вариабельность и повторные вариации анализа указывают, что различие между повторными образцами или между субпопуляциями единичной культуры часто равно или превышает различия в ФА между линиями. Хотя стандартное отклонение уровней ФА для повторных клеточных культур составляет около 10 % значения для установленных линий, оно обычно колеблется от 20 до более чем 100 % значения повторных тканевых образцов и первичных культур, приготовленных из тканевых образцов (Albrechtsen, 1957; Bernick, Kwaan, 1969; Barrett et al., 1979). Клональная вариация даже больше. В серии клонов человеческой линии TE85 различия между клонами с наивысшей и наинизшей фибринолитической активностью составляли 925 % (Jones et al., 1975). Подобная степень клональной вариабельности указывалась для куриных эмбриональных фибробластов и их трансформантов вирусом саркомы Рауса (Wolf, Goldberg, 1976).

2.6.4. Резюме

Корреляция между туморогенностью и фибринолитической активностью или продукцией активатора плазминогена отсутствует. Эта утрата корреляции документирована для тканей in vivo на основе интенсивных исследований. Ранние литературные сообщения, свидетельствующие об увеличении активатора плазминогена при онкогенной трансформации, были необоснованными и явились результатом того, что должным образом не проявлялся нормальный статус или туморогенность использованных клеточных линий и убежденность в онкогенных вирусах как возможных трансформирующих агентах. Стимуляция активатора плазминогена не имеет причинной связи с трансформацией, а, вероятно, отражает отдельный механизм вирусного действия.

2.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Образование опухолей in vivo инокуляцией клеток требует, чтобы клетки были трансплантабельны и способны к прогрессивному росту. Выход трансплантатов широко варьирует и зависит от типа трансплантируемой ткани и природы хозяина-реципиента. Хотя выход может случайно достичь 100 %, наиболее типичны колебания от 25 до 50 %. Процент опухолей, которые затем прогрессивно растут вслед за успешной трансплантацией, также вариабелен, однако редко превышает 50 % и часто существенно меньше. Выход индивидуальной опухоли чрезвычайно чувствителен к методу трансплантации, может варьировать на порядки в зависимости от степени гистосовместимости с хозяином-реципиентом, размера инокулята, места трансплантации, зависимости клеток от субстрата, типа диссоциирующей процедуры для приготовления клеток. Кроме того, образование опухолей зависит не только от этих параметров, но и от длительности периода наблюдения по сравнению с латентным периодом новообразования и скоростью прогрессивного роста. В отсутствие обширной методологической оптимизации неопластические ткани обычно не формируют опухоли in vivo и неправильно классифицируются как нормальные. Хотя и намного реже, нормальные ткани могут случайно приводить к прогрессивному росту и могут быть неправильно классифицированы как опухоли в отсутствие тщательного гистологического анализа. Таким образом, чрезвычайно трудной задачей является тщательное и точное установление нормального статуса или туморогенности клеточной популяции.

В настоящей главе мы задались вопросом, могут ли изменения в клеточной морфологии, организации цитоскелета, зависимости от субстрата, агглютинабельности Кон А, продукции активатора плазминогена, сопровождающие онкогенную трансформацию достаточно часто, служить надежными индикаторами клеточной туморогенности. В главе 3 взаимосвязь между туморогенностью и изменениями мембранных антигенов, сиалированием и гликозилированием гликопротеина также рассматривается.

Ни одно из этих изменений не может рассматриваться как доказуемая связь с онкогенной трансформацией и не может обоснованно признаваться как индикатор клеточной туморогенности широкого спектра. Однако использование множественных цитологических критериев, как доказано, может быть надежным индикатором туморогенности для двух специфических крысиных систем, и было бы крайне интересно определить, может ли данный метод иметь более широкое применение.

Исследования in vitro онкогенной трансформации являются предметом ряда артефактов, которые осложняют интерпретацию экспериментальных данных и ведут к ошибочным заключениям о возможной связи между туморогенностью и изменениями клеточного фенотипа. Самый важный источник ошибки в подобных исследованиях — неправильная классификация нормального статуса и туморогенности использованных клеточных линий. Клетки в культуре кариотипиче-

ски и генетически нестабильны. Эта нестабильность ведет к быстрому видообразованию, когда клетки той же наследственной популяции размножались отдельно. Природа этого видообразования чрезвычайно чувствительна к точным условиям культивирования, и клетки того же номинального вида, размножаемые в различных лабораториях, часто становятся различными типами клеток. Из-за этого видообразования данные литературы о нормальном статусе или туморогенности индивидуальной клеточной линии не могут быть обоснованными для клеток той же номинальной линии, растущей отдельно в различных лабораториях.

Так как нормальные клетки в культуре подвергаются онкогенной трансформации (тогда как истинно неопластические клетки иногда утрачивают туморогенность) статус клеток в отдельной лаборатории не может оставаться постоянным в течение любого значительного периода времени. Нельзя делать предположение о природе клеток на основании их тканевого происхождения. Опухоли содержат нормальные клетки, которые могут хорошо расти преимущественно в культуре, а нормальные клетки в культуре часто подвергаются спонтанной трансформации. Подобным же образом нельзя предположить, что клетка туморогенна просто потому, что подвергалась действию агента, способного индуцировать онкогенную трансформацию. Эффективность трансформации онкогенных вирусов и химических канцерогенов часто чрезвычайно низка. Таким образом, нормальный статус или туморогенность клеточной линии никогда не может предполагаться. Они могут быть установлены только прямой пробой in vivo. В корреляционных исследованиях пробы на туморогенность, если они уместны, должны осуществляться на тех же клетках, того же уровня пассажа из тех же культур, как и клетки, используемые для изучения фенотипического свойства.

Второй источник ошибки в туморогенно-корреляционных исследованиях — это абсолютная уверенность в клеточных линиях, трансформированных онкогенными вирусами. Такие линии не являются представительными для опухолевых клеток в общем и в большинстве фенотипических изменений, которые они проявляют, представляют вирусные эффекты, не связанные с туморогенностью per se. Подобная проблема возникает при выборе нормальных «контрольных» клеточных популяций. Несколько установленных линий, наиболее часто используемых с этой целью, в действительности являются аномальными. Линия ВНК — истинно неопластическая, обе линии 3Т3 и С3Н-10Т$\frac{1}{2}$/С18 — аномальные, по крайней мере, пренеопластические. Эмбриональные клетки на ранних пассажах являются нормальными, но они также неопределенных популяций, отличаются фундаментально от более зрелых и дифференцированных клеток, которые дают рост большинству опухолей и не охватывают достаточно широкий спектр, чтобы обеспечить надежную оценку колебания характеристик, что может быть выражено несколькими дюжинами дифференцированных клеток, включающих взрослые ткани млекопитающих. Утрата адекватного спектра нормальных контрольных клеточ-

ных популяций является одной из наиболее серьезных трудностей в туморогенно-корреляционном исследовании.

Установленные клеточные линии, которые являются туморогенными, обычно поддерживались в культуре в течение длительного времени. Как группа, они, по-видимому, обладают слабым сходством в их клеточных характеристиках либо в опухолях in vivo, либо в первичных культурах, приготовленных из опухолей. Большинство нормальных тканей, используемых в туморогенно-корреляционных исследованиях, являются клетками на ранних пассажах, которые еще не адаптированы к условиям культивирования in vitro. Есть серьезная причина подозревать, что многие видимые различия между нормальными и трансформированными клеточными культурами не имеют связи с туморогенностью, а вместо этого отражают различия в степени адаптации тканевой культуры к окружению.

Более чем триста видов человеческих опухолей к настоящему времени распознаваемы по гистологическим критериям, и каждый вид млекопитающих, по-видимому, становится жертвой подобного числа опухолевых заболеваний. Таким образом, только по гистологическим критериям полдюжины видов млекопитающих, обычно используемых в экспериментальной онкологии, могут быть представлены более чем тысячей различных неоплазий. Это число почти определенно переоценивается и будет, вероятно, увеличиваться в несколько раз по гистологическим критериям, поддержанным биохимическими параметрами, в таксономии опухоли.

В то время как индикаторы туморогенности с доказанной обоснованностью могут появляться в результате текущих или будущих исследований, необходимо справедливо постулировать, что в настоящее время нет клеточных характеристик, которые строго бы коррелировали с туморогенностью и могли бы быть диагностическими для широкого спектра клеточных типов.

После интенсивных в течение трех десятилетий исследований в поисках такого индикатора рассматривалось множество клеточных характеристик, но ни одна из них не может приемлемо восприниматься как индикатор туморогенности. Следовательно, рассмотрение специфических клеточных изменений, которые могут играть роль в развитии индивидуальных опухолей, обеспечит более продуктивный путь для будущих исследований, чем продолжающиеся попытки открыть индикатор широкого спектра, который, по всей вероятности, не существует.

2.8. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams R. A., Foley G. E., Farber S., Flowers A., Lazarus H., Hellerstein E. E. (1970). Serial transplantation of Burkitt's tumor (EB3) cells in newborn Syrian hamsters and its facilitation by antilymphocyte serum. Cancer Res. 30, 338—345.
2. Aden D. P., Knowles B. B. (1977). Tumorigenicity of intraspecific somatic cell hybrids in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. 58, 743—746.
3. Agostino D. Cliffton E. E. (1962). Decrease of metastases of carcinosarcoma Walker 256 with irradiation and heparin or fibrinolytic agents. Radiology 79, 848—855.

4. Albrechtsen O. K. (1957). The fibrinolytic activity of human tissues. Br. J. Haematol. 3, 284—291.
5. Ambrus J. L., Ambrus C. M., Gastpar H. (1978). Tumor metastasis and platelet aggregation. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 19, 83.
6. Asch B. B., Medina D., Brinkley B. R. (1979). Microtubules and actin containing filaments of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary epithelial cells. Cancer Res. 39, 893—907.
7. Asch B. B., Medina D. (1978). Concanavalin A-induced agglutinability of normal, preneoplastic, and neoplastic mouse mammary cells. J. Natl. Cancer Inst. 61, 1423—1430.
8. Asch J. F., Vogt P. K., Singer S. J. (1976). Reversion from transformed to normal phenotype by inhibition of protein synthesis in rat kidney cells infected with a temperature sensitive mutant of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3603—3607.
9. Astrup T., Permin P. (1947). Fibrinolysis in the animal organism. Nature (London) 159, 681—682.
10. Astrup T., Mullerty S. (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40, 346—351.
11. Auerbach R., Morrissey L. W., Sidky Y. A. (1978). Regional differences in the incidence and growth of mouse tumors following intradermal or subcutaneous innoculation. Cancer Res. 38, 1739—1744.
12. Barker B. E., Sanford K. K. (1970). Cytologic manifestations of neoplastic transformation in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 44, 39—63.
13. Barrett J. C., Crawford B. D., Mixter L. O., Schechtman L. M., Ts'o, P. O. P., Pollack R. (1979). Correlation of in vitro growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. Cancer Res. 39, 1504—1510.
14. Beers W. H., Strickland S., Reich E. (1975). Ovarian plasminogen activator: Relationship to ovulation and hormonal regulation. Cell. 6, 387—394.
15. Benedict W. F., Jones P. A., Laug W. E., Igel H. J., Freeman A. E. (1975). Characterization of human cells transformed in vitro by urethane. Nature (London), 256, 322—324.
16. Berenbaum M. C., Sheard C. E., Reittie J. R., Bundick R. V. (1974). The growth of human tumors in immunosuppressed mice and their response to chemotherapy. Br. J. Cancer 30, 13—32.
17. Berlin R. D. (1972). Effects of concanavalin A on phagocytosis. Nature (London), New Biol. 235, 44—45.
18. Berlin R. D., Ukena T. E. (1972). Effect of colchicine and vinblastine on the agglutination of polymorphonuclear leucocytes by concanavalin A. Nature (London), New Biol. 238, 120—122.
19. Berman L. D. (1975). Lack of correlation between growth characteristics, agglutinability by plant lectins and the malignant phenotype. Int. J. Cancer 15, 973—979.
20. Bernick M. B., Kwaan H. C. (1969). Plasminogen activator activity in cultures from human tissues. An immunological and histochemical study. J. Clin. Invest. 48, 1740—1753.
21. Birch J. R., Pirt S. J. (1970). Improvements in a chemically defined medium for the growth of mouse cells (strain LS) in suspension. J. Cell. Sci. 7, 661—670.
22. Boone C. W., Takeichi N., Paranjpe M., Gilden R. (1976). Vasoformative sarcomas arising from BALB/3T3 cells attached to solid substrates. Cancer Res. 36, 1626—1633.
23. Boone C. W., Vembu D., White B. J., Takeichi N., Paranjpe M. (1979). Karyotypic, antigenic, and kidney-invasive properties of cell lines from fibrosarcomas arising in C3H/10T cells implanted subcutaneously attached to plastic plates. Cancer Res. 39, 2172—2178.
24. Brinkley B. R., Fuller G. M., Highfield D. P. (1975). Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: Analysis by tubulin antibody immunofluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 4981—4985.
25. Brown J. C. (1973). Effects of concanavalin A on the sensitivity of mouse L cell surface glycoproteins to proteolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 686—692.

26. Burford F. K., Sanders B. O. (1964). Ascites tumours from BHK-21 cells transformed in vitro by polyoma virus. Nature (London) 201, 786—789.
27. Burger M. M., Goldberg A. R. (1967) Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 57, 359—366.
28. Burger M. M., Martin G. S. (1972). Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus by wheat germ agglutinin and concanavalin A. Nature (London), New Biol. 237, 9—12.
29. Carlsson J. (1978). Physical and nutritional factors in gel culture of mammalian cells. In Vitro 14, 860—867.
30. Carrino D., Gershman H. (1977). Division of BALB/c mouse 3T3 and simian virus 40-transformed 3T3 cells in cellular aggregates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3874—3878.
31. Castor L. (1968). Contact regulation of cell division in an epithelial-like cell line. J. Cell. Physiol. 72, 161—162.
32. Castro J. E. (1972). Human tumors grown in mice. Nature (London), New Biol. 239, 83—84.
33. Chen L. B., Gallimore P. H., McDougall J. K. (1976). Correlation between tumor induction and the large external transformation-sensitive protein on the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3570—3574.
34. Chew E. C., Josephson R. L., Wallace A. C. (1976). Morphologic aspects of the arrest of circulating cancer cells. In «Fundamental Aspects of Metastasis» (L. Weiss, ed.), pp. 121—150. North-Holland Publ., Amsterdam.
35. Christman J. K., Acs G. (1974). Purification and characterization of a cellular fibrinolytic factor associated with oncogenic transformation: The plasminogen activator from SV40 transformed hamster cells. Biochim. Biophys., Acta 340, 339—347.
36. Chute R. N., Sommers S. C., Shields W. (1952). Heterotransplantation of human cancer. II. Hamster cheek pouch. Cancer Res. 12, 912—914.
37. Cikes M. (1970). Relationship between growth rate, cell volume, cell cycle kinetics, and antigenic properties of cultured murine lymphoma cells. J. Natl. Cancer Inst. 45, 979—988.
38. Cliffton E. E., Grossi C. E. (1955). Fibrinolytic activity of human tumors as measured by the fibrin-plate method. Cancer (Phyladelphia) 8, 1146—1154.
39. Cline M. C., Livingston D. C. (1971). Binding of ^{3}H-concanavalin A by normal and transformed cells. Nature (London), New Biol. 232, 155—156.
40. Cobb L. M. (1973). The behavior of carcinoma of the large bowel in man following transplantation into immune deprived mice. Br. J. Cancer 28, 400—411.
41. Colburn N. H., Bruegge W. F. V., Betes J. R., Gray R. H., Rosen J. D., Kelsey W. H., Shimada T. (1978). Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells. Cancer Res. 38, 624—634.
42. Cook J. L., Lewis A. M., Jr., Kirkpatrick C. H. (1969). Age-related and thymus-dependent rejection of adenovirus 2-transformed cell tumors in the Syrian hamster. Cancer Res. 39, 3335—3340.
43. Courtenay V. D., Selby P. J., Smith I. E., Mills J., Peckham M. J. (1978). Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. Br. J. Cancer, 38, 77—81.
44. Crile G., Isbister W., Deodhar S. V. (1971). Demonstration that large metastases in lymph nodes disseminate cancer cells to blood and lungs. Cancer (Philadelphia) 28, 655—661.
45. Cuatrecasas P. (1973). Interactions of wheat germ agglutinin and concanavalin A with isolated fat cells. Biochemistry 12, 1312—1323.
46. Culp L. A., Black P. H. (1972). Contact-inhibited revertant cell lines isolated from simian virus 40-transformed cells. IV. Concanavalin A-selected revertant cells. J. Virol. 9, 611—620.
47. Culp L. A. (1976). Electrophoretic analysis of substrate-attached proteins from normal and virus-transformed cells. Biochemistry 15, 4094—4104.
48. Davis E. M., Starling J. J., Walborg E. F., Jr. (1976). A microquantitative method to characterize lectin-induced sytoagglutination. Exp. Cell Res. 99, 37—46.

49. Dawe C. J., Potter M., Leighton J. (1958). Progressions of a reticulum-cell sarcoma of the mouse in vivio and in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 21, 753--781.
50. Dawe C. J., Law L. W. (1959). Morphologic changes in salivary-gland tissue of the newborn mouse exposed to parotid-tumor agent in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 23, 1157--1177.
51. DeBruyn W. M., Hansen-Melander E. (1962). Chromosome studies in the MB mouse lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 28, 1333—1354.
52. Defendi V., Lehman J., Kraemer P. (1963). «Morphologically normal» hamster cells with malignant properties. Virology 19, 592—598.
53. Deman J., Bruyneel E. (1973). A method for the quantitative measurement of cell aggregation. Exp. Cell Res. 81, 351—359.
54. DeMey J., Joniau M., DeBrabander M., Moens W., Geuens G. (1978). Evidence for unaltered structure and in vivo assembly of microtubules in transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 1339—1342.
55. Dermer G. B., Luc J., Neustein H. B. (1974). Comparison of surface material, cytoplasmic filaments, and intercellular junctions from untransformed and two mouse sarcoma virus-infected cell lines. Cancer Res. 34, 31—38.
56. Dicke K. A., Platenburg M. G. C., Van Bekkum D. W. (1971). Colony formation in agar; In vitro assay for haemopoietic stem cells. Cell Tissue Kinet. 4, 463—477.
57. Eagle H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 432—437.
58. Eagle H., Piez K. A., Levy M. (1961). The intracellular amino acid concentrations required for protein synthesis in cultured human cells. J. Biol. Chem. 236, 2039—2042.
59. Earle W. R. (1935). A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. Am. J. Cancer 24, 566—612.
60. Earle W. R., Nettleship A. (1943). Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice. J. Natl. Cancer Inst. 4, 213—227.
61. Earle W. R., Schilling E. L., Stark T. H., Strauss N. P., Brown M. F., Shelton E. (1943). Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Natl. Cancer Inst. 4, 165—212.
62. Earle W. R., Schilling E. L., Bryant T. C., Evans V. J. (1954). The growth of pure L strain mouse cells in fluid suspension cultures. J. Natl. Cancer Inst. 14, 1159—1171.
63. Earle W. R. (1957). Untitled. J. Natl. Cancer Inst. 19, 771—784.
64. Ebbeson P., Olsson L., Rudkobing O., Haahr S., Kristensen G. (1977). Correlation of in vivo cancer, net outer charge, in vitro migration, interferon activity, in vitro growth rates, and chalone-like activity to transformation-reversion in cloned Moloney and Kirsten sarcoma virus-transformed mouse 3T3 cells. Cancer Res. 37, 4285—4290.
65. Eckhart W., Dulbecco R., Burger M. M. (1971). Temperature-dependent surface changes in cells infected or transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 68, 283—286.
66. Edelman G. M., Yahara I. (1976). Temperature-sensitive changes in surface modulating assemblies of fibroblasts transformed by mutants of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2047--2051.
67. Epstein A. L., Herman M. M., Kim H., Dorfman R. F., Path M. R. C., Kaplan H. S. (1976). Biology of the human malignant melanomas. III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. Cancer (Phyladelphia) 37, 2158—2176.
68. Evans C. E., DiPaolo J. A. (1975). Neoplastic transformation of guinea pig fetal cells in culture induced by chemical carcinogens. Cancer Res. 35, 1035—1044.
69. Evans V. J., Hawkins M. M., Westfall B. B., Earle W. R. (1958). Studies on culture lines derived from mouse liver parenchymatous cells grown in long-term tissue culture. Cancer Res. 18, 261—266.
70. Fidler I. J. (1970). Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with ^{125}J-5-iodo-2′-deoxyuridine. J. Natl. Cancer Inst. 45, 775—782.

71. Fidler I. J. (1974). Immune stimulation-inhibition of experimental cancer metastasis. Cancer Res. 34, 491—497.
72. Fidler I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. Cancer Res. 35, 218—244.
73. Fischer A. (1925). Beitrag zur Biologie der Gewebezellen eine vergleichend-biologische Studie der normalen und malignen Gewebezellen, in vitro. Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech. 104, 210.
74. Fisher B., Fisher E. R. (1967). Anticoaggulants and tumor cell lodgement. Cancer Res. 27, 421—425.
75. Fogh J., Hok K. A. (1958). Tumor production in X-ray and cortisone-treated rats given injections of human cells in continuous cultivation. Cancer Res. 18, 692—697.
76. Fogh J., and Giovanella B. C. (1978). «The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.» Academic Press, New York.
77. Fogh J., Tiso J., Orfeo T., Sharkey F. E. (1979). Tumor lines from six human tumor categories established in nude mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 246.
78. Foley E. J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Res. 13, 835—837.
79. Foley G. E., Drolet B. P. (1964). Loss of neoplastic properties in vitro: I. Observations with S-180 cell lines. Cancer Res. 24, 1461—1467.
80. Forsberg J.-G., Nordqvist S. (1969). Growth and hormonal responsiveness of human endometrial carcinoma after heterologous transplantation to neonatal rats. J. Natl. Cancer Inst. 43, 191—197.
81. Freedman V. H., Shin S. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. Cell 3, 355—359.
82. Friberg S., Jr., Golub S. H., Lilliehook B., Cochran A. J. (1972). Assessment of concanavalin A. reactivity to murine ascites tumours by inhibition of tumour cell migration. Exp. Cell Res. 73, 101—106.
83. Friedman S. J., Skehan P. J. (1979). Morphological differentiation of human choriocarcinoma cells induced by methotrexate. Cancer Res. 39, 1960—1967.
84. Furmanski P., Phillips P. G., Lubin M. (1972). Cell surface interactions with concanavalin A: Determination by microhemadsorption. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 216—219.
85. Gabbiani G., Csank—Brassert J., Schneeberger J.—C., Kapanci Y., Trencher P., Holborow J. (1976). Contractile proteins in human cancer cells. Am. J. Pathol. 83, 457—474.
86. Gallagher F. W., Korson R. (1959). Growth of human cancer (HEp 3) in normal rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 805—807.
87. Gallimore P. H., McDougall J. K., Chen L. B. (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. Cell 10, 669—678.
88. Garcia H., Gasic G., Baydak T. (1963). Viable tumor cells in blood and lungs of mice with metastasizing and non-metastasizing transplantable tumors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 914—921.
89. Gasic G. J., Gasic T. B., Galanti N., Johnson T., Murphy S. (1973). Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. Int. J. Cancer 11, 704—718.
90. Gershon R. K., Carter R. L., Kondo K. (1967). On concomitant immunity in tumor-bearing hamsters. Nature (London) 213, 674—676.
91. Gey G. O. (1941). Cytological and cultural observations on transplantable rat sarcomata produced by the inoculation of altered normal cells maintained in continuous culture. Cancer Res. 1, 737.
92. Giard D. G., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 51, 1417—1423.
93. Giovanella B. C., Stehlin J. S., Lee S. S., Shepard B., Williams L. L., Jr. (1976). Heterotransplantation of human breast carcinomas in «nude» thymus deficient mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 17, 124.

94. Giovanella B. C., Fogh J. (1978). Present and future trends in investigations with nude-mouse as a recipient of human tumor transplants. In «The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research» (J. Fogh and B. C. Giovanella, eds.), pp. 281—312. Academic Press, New York.
95. Glimelius B., Nilsson K., Ponten J. (1975). Lectin agglutinability of non-neoplastic and neoplastic human lymphoid cells in vitro. Int. J. Cancer 15, 888-896.
96. Goldberg A. R. (1974). Increased protease levels in transformed cells: A casein overlay assay for the detection of plasminogen activator production. Cell 2, 95—102.
97. Goldberg D. M., Pavia R. A., (1979). Tumorigenesis of nude mouse stroma from human tumor xenografts. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 94.
98. Goldman R. D., Chang C., Williams J. F. (1974). Properties and behavior of hamster embryo cells transformed by human adenovirus type 5. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 601—614.
99. Goldman R. D., Yerna M. J., Schloss J. A. (1976). Localization and organization of microfilaments and related proteins in normal and virus-transformed cells. J. Supramol. Struct. 5, 155—183.
100. Gordon J. A., Marquardt M. D. (1974). Factors affecting hemagglutination by concanavalin A and soybean agglutinin. Biochim. Biophys. Acta 332, 136—144.
101. Graff R. J., Valeriote F., Medoff G. (1975). Marked histoincompatibility between and within sublines of AKR mice used in a syngeneic leukemia model. J. Natl. Cancer Inst. 55, 1015—1021.
102. Greene H. S. N. (1938). Heterologous transplantation of human and other malignant tumors. Science 88, 357—358.
103. Greene H. S. N. (1951). The transplantation of tumors to the brains of heterologous species. Cancer Res. 11, 529—534.
104. Greene H. S. N. (1952). The significance of the heterotransplantability of human cancer. Cancer (Philadelphia) 5, 24—55.
105. Griffiths J. B. (1970). The quantitative utilization of amino acids and glucose and contact inhibition of growth in cultures of the human diploid cell, WI—38. J. Cell Sci. 6, 739—749.
106. Grimes W. J. (1974). Biological and biochemical characterization of surface changes in normal, MSV- and SV40-transformed, and spontaneously transformed clones of BALB/c cells. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 517—531. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
107. Grossi C. E., Agostino D., Cliffton E. E. (1960). The effect of human fibrinolysin on pulmonary metastases of Walker 256 carcinoma. Cancer Res. 20, 605—608.
108. Hagmar B., Norrby K. (1973). Influence of cultivation, trypsinization and aggregation on the transplantability of melanoma B16 cells. Int. J. Cancer 11, 663—675.
109. Handler A. H., Davis S., Sommers S. C. (1956). Heterotransplantation experiments with human cancers. Cancers Res. 16, 32—36.
110. Harwood L. M. J., Gallimore P. H. (1975). A study of the oncogenicity of adenovirus type 2 transformed rat embryo cells. Int. J. Cancer 16, 498—508.
111. Hewitt H. B. (1978). The choice of animal tumors for experimental studies of cancer therapy. Adv. Cancer Res. 27, 149—200.
112. Higuchi K. (1970). An improved chemically defined culture medium for strain L mouse cells based on growth responses to graded levels of nutrients including iron and zinc. J. Cell. Physiol. 75, 65—72.
113. Hince T. A., Roscoe J. P. (1978). Fibrinolytic activity of cultured cells derived during ethylnitrosourea-induced carcinogenesis of the rat brain. Br. J. Cancer 37, 424—433.
114. Hofer K. G., Prensky W., Hughes W. L. (1969). Death and metastatic distribution of tumor cells in mice monitored with ^{125}I-iododeoxyuridine. J. Natl. Cancer Inst. 43, 763—773.
115. Holley R. W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. Nature (London) 258, 487—490.

116. Howett M. K., High C. S., Rapp F. (1978). Production of plasminogen activator by cells transformed by herpes-virus. Cancer Res. 38, 1075—1078.
117. Hu F., Lesney P. F. (1964). The isolation and cytology of two pigment cell strains from B16 mouse melanomas. Cancer Res. 24, 1634—1643.
118. Huebner R. J., Fish D. C., Djurickovic D., Trimmer R. W., Bare A. L., Bare R. M., Smith G. T. (1979). Introduction of rat sarcomas in rats treated with antithymocyte sera after transplantation of human cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 1793—1794.
119. Hwang K. M., Murphree S. A., Sartorelli A. C. (1974). A quantitative spectrophotometric method to measure plant lectin-induced cell agglutination. Cancer Res. 34, 3396—3402.
120. Inbar M., Sachs L. (1969). Interactions of the carbohydrates-binding compound concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 63, 1418—1425.
121. Ishii Y., Elliott J. A., Mishra N. K., Lieberman M. W. (1977). Quantitative studies of transformation by chemical carcinogens and ultraviolet radiation using a subclone of BHK_{21} clone 13 Syrian hamster cells. Cancer Res. 37, 2023—2029.
122. Jacoby F. (1943). Long-term cultivation in vitro of a dibenzanthracene mouse sarcoma. Nature (London) 152, 299.
123. Jaken S., Black P. H. (1979). Differences in intracellular distribution of plasminogen activator in growing confluent, and transformed 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 246—250.
124. Jamabasi R. J., Nettesheim P. (1979). Increase in immunogenicity with concomitant loss of tumorigenicity of respiratory tract carcinomas during in vitro culture. Cancer Res 39, 2466—2470.
125. James K. (1967). Anti-lymphocyte antibody — A review. Clin. Exp. Immunol. 2, 615—632.
126. Jones P. A., Rhim J. S., Isaacs H., Jr., McAllister R. M. (1975). The relationship between tumorigenicity, growth in agar and fibrinolytic activity in a line of human osteosarcoma cells. Int. J. Cancer 16, 616—621.
127. Jones P. A., Laug W. E., Gardner A., Nye C. A., Fink L. M. Benedict W. F., Jr. (1976). In vitro correlates of transformation in C3H/10T clone 8 mouse cells. Cancer Res. 36, 2863—2867.
128. Jurin B. (1973). Loss and recovery of transplantability of L-959 cells. In Vitro 8, 379—382.
129. Kahn P., Shin S.-I. (1979). Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of association among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. J. Cell Biol. 82, 1—16.
130. Kakanuga T., Kamahora J. (1968). Properties of hamster embryonic cells transformed by 4-nitroquinoline-1-oxide in vitro and their correlations with the malignant properties of the cells. Biken J. 11, 313—332.
131. Kaneko I., Hikoya H., Tyunosin U. (1975). A quantitative assay for concanavalin A- and Ricinus communis agglutinin-mediated agglutinations of rat ascites hepatoma cells. Biochim. Biophys. Acta 392, 131—140.
132. Kessner A., Troll B. (1976). Fluorometric microassay of plasminogen activators. Arch. Biochem. Biophys. 176, 411—416.
133. Kim U. (1970). Metastasizing mammary carcinomas in rats: Induction and study of their immunogenicity. Science 167, 72—74.
134. Klein G., Klein E. (1956). Conversion of solid neoplasms into ascites tumors. Ann. N. Y. Acad. Sci. 63, 640—661.
135. Klein G., Klein E. (1977). Rejectability of virus-induced tumors and nonrejectability of spontaneous tumors: A lesson in contrasts. Transplant. Proc. 9, 1095—1104.
136. Knowles M. A., Franks L. M. (1978). Ultrastructure and biological markers of neoplastic change in adult mouse epithelial cells transformed in vitro. Br. J. Cancer 37, 603—611.
137. Koyama K., Nudelman E., Fukuda M., Hakomori S.- I. (1979). Correlation of glycosylation in a membrane protein with a molecular weight of 150,000 with tumorigenic property of rat fibrosarcoma variants. Cancer Res. 39, 3677—3682.

138. Kruse P. J., Myhr B. C., Jackson J. E., White P. B. (1963). Perfusion system for replicate mammalian cell cultures in T-60 flasks. J. Natl. Cancer Inst. 31, 109—124.
139. Kurimura T., Hirano A. (1972). Surface characteristics of SV40 transformed transplantable and non-transplantable mouse cells. Biken J. 15, 193—197.
140. Kutner L. J., Southam C. M. (1960). Growth of human cancer cells (HEP 2) in newborn rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 785—787.
141. Laird A. K. (1969). Dynamics of growth in tumors and in normal organisms. Natl. Cancer Inst., Monogr. 30, 15—28.
142. Laug W. E. (1979). Anchorage independent growth and plasminogen activator production by bovine endothelial cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 96.
143. Leavitt J. C., Crawford B. D., Barrett J. C., Ts'o P. O. P. (1977). Regulation of requirements for anchorage-independent growth of Syrian hamster fibroblasts by somatic mutation. Nature (London) 269, 63—65.
144. Lemon H. M., Lutz B. R., Pope R., Parsons L., Handler A. H., Patt D. I., (1952). Survival and growth of human tissues transplanted to hamster cheek pouch. Science 115, 461—463.
145. Leong S. S., Sokal J. E., Gomez G. A., Horoszewicz J. S. (1979). Circulating colony-forming cells in different stages of chronic myelocytic leukemia. Cancer Res. 39, 2704—2710.
146. Lewis J. L., Davis R. C., Parker J. T. (1969). Modification of the immunologic response to human choriocarcinoma in the hamster cheek pouch by heterologous antilymphocyte serum. Cancer Res. 29, 1988—1994.
147. Linnemans W. A. M., Spies F., DeRuyter de Wildt T. M., Elbers P. F. (1976). Kinetics of cell agglutination. A quantitative assay of concanavalin A mediated agglutination of Acanthomoeba castellanii. Exp. Cell Res. 101, 191—201.
148. Liotta L. A., Kleinerman J., Saidel G. M. (1976). Significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res. 36, 889—894.
149. Little C. C., Tyzzer E. E., (1916). Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (J. w. A.) of the Japanese waltzing mouse. J. Med. Res. 33, 393—453.
150. Lueker D. C., Stewart I. B., Kainer R. A. (1979). Letter to the editor. Cancer Res. 39, 3277—3278.
151. Maca R. D., Hoak J. C. (1974). Improved method for quantitation of concanavalin A-induced agglutination. J. Natl. Cancer Inst. 52, 365—367.
152. MacPherson I. (1963). Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus. J. Natl. Cancer Inst. 30, 795—815.
153. MacPherson I., Montagnier L. (1964). Agar suspension culture for the selective assay of the cells transformed by polyoma virus. Virology 23, 291—294.
154. Madyastha K. R., Phondke G. B., Madyastha P. R., Barth R. F. (1978). Effects of enzymes and polyelectrolytes on the aggregation properties of metastatic melanoma cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 19, 221.
155. Malech H. L., Lentz T. L. (1974). Microfilaments in epidermal cancer cells. J. Cell Biol. 60, 473—482.
156. Marciani D. J., Lyons L. B., Thompson E. B. (1976). Characteristic of cell membranes from somatic cell hybrids between rat hepatoma and mouse L-cells. Cancer Res. 36, 2937—2944.
157. Maroudas N. G. (1972). Anchorage dependence: Correlation between amount of growth and diameter of bead, for single cells grown on individual glass beads. Exp. Cell Res. 74, 337—342.
158. Marshall C. J., Franks L. M., Carbonell A. W. (1977). Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. J. Natl. Cancer Inst. 58, 1743—1751.
159. McAllister R. M., Coriell L. L. (1959). Tumorigenicity of tissue culture cells. Cancer Res. 19, 1040—1044.
160. McAllister R. M., Reed G. (1968). Colonial growth in agar of cells derived from neoplastic and non-neoplastic tissues of children. Pediatr. Res. 2, 356—360.
161. McFarland V. W., Mora P. T., Schultz A., Pancake S. (1975). Cell properties after repeated transplantation of spontaneous and of SV40 virus transformed mouse cell lines. I. Growth in culture. J. Cell. Physiol. 85, 101—112.

162. McKeehan W. L. (1977). The effect of temperature during trypsin treatment on viability and multiplication potential of single normal human and chicken fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep. 1, 335—343.
163. McNutt N. S., Culp L. A., Black P. G. (1973). Contact-inhibited revertant cell lines isolated from SV40-transformed cells. IV. Microfilament distribution and cell shape in untransformed, transformed, and revertant BALB/c 3T3 cells. J. Cell. Biol. 56, 412—428.
164. McNutt N. S. (1976). Ultrastructural comparison of the interface between epithelium and stroma in basal cell carcinoma and control human skin. Lab. Invest. 35, 132—142.
165. Meager A., Nairn R., Hughes R. C., Garrett A. J., Reeson D. E. (1978). Tumorigenicity of adenovirus-5-transformed BHK cell lines with various transformation-associated properties. Br. J. Cancer 37, 566—570.
166. Medina D., Sachs L. (1961). Cell-virus interactions with the polyoma virus: The induction of cell transformation and malignancy in vitro. Br. J. Cancer 15, 885—904.
167. Miller E. A., Fuseler J. W., Brinkley B. R. (1977). Cytoplasmic microtubules in transformed human cell hybrids: Correlates with in vitro growth. Cell 12, 319—331.
168. Mishra N. K., Ryan W. L. (1973). Effect of 3-methylcholanthrene and dimethylnitrosamine on anchorage dependence of rat fibroblasts chronically infected with Rauscher leukemia virus. Int. J. Cancer 11, 123—130.
169. Montagnier L. (1969). Necessite de precurseurs puriqus pour l'expression d'un caractere de la transformation chez les cellules BHK 21/13, C. R. Acad. Sci., Ser. D. 268, 2218—2221.
170. Montagnier L., Gruest J. (1969). Cell-density-dependence for growth in agarose of two human lymphoma lines and its decrease after Epstein-Barr virus conversion. Int. J. Cancer 23, 71—75.
171. Montesano R., Saint Vincent L., Devron C., Tomatis L. (1975). Production of epithelial and mesenchymal tumours with rat liver cells transformed in vitro. Int. J. Cancer 16, 550—558.
172. Montesano R., Devron C., Kuroki T., Saint Vincent L., Handleman S., Sanford K. K., Defao D., Weinstein I. B. (1977). Test for malignant transformation of rat liver cells in culture: Cytology, growth in soft agar, and production of plasminogen activator. J. Natl. Cancer Inst. 59, 1651—1658.
173. Moore A. E. (1958). Tumorigenic activity of cultures. Ann. N. Y. Acad. Sci. 76, 497—505.
174. Moore J., Kieler J., Biczowa B. (1968). Comparative studies of a neartetraploid and a near-diploid line of Ehrlich's ascites tumor propogated in vivo and in vitro. II. Cytologyc and transplantability. Eur. J. Cancer 4, 81—95.
175. Morgan J. F., Eng C. P. (1972). The induction of immunoprotection by mouse ascites tumor cells attenuated in tissue culture. Eur. J. Cancer 8, 293—298.
176. Moscona A. A. (1971). Embryonic and neoplastic cell surfaces: Availability of receptors for concanavalin A and wheat germ agglutinin. Science 171, 905—907.
177. Nicolson G. L. (1972). Topography of membrane concanavalin A sites modified by proteolysis. Nature (London), New Biol., 239, 193—197.
178. Nicolson G. L., Birdwell C. R., Brunson K. W., Robbins J. C., Beattie G., Fidler I. J. (1977). Cell interactions in the metastatic process. In «Cell and Tissue Interactions» (J. W. Lash and M. Burger, eds.), pp. 225—242. Raven, New York.
179. Nomura S., Dunn K. J., Mattern C. F. T., Hartley J. W., Fischinger P. J. (1974). Revertants of mouse cells transformed by murine sarcoma virus: Flat variants without a rescuable sarcoma virus from a clone of BABL/3T3 transformed by Kirsten MSV. J. Gen. Virol. 25, 207—218.
180. Noonan K. D., Burger M. M. (1973). Binding of ^{3}H-concanavalin A to normal and transformed cells. J. Biol. Chem., 248, 4286—4292.
181. Oppenheimer S. B., Odencrantz J. (1972). A quantitative assay for measuring cell agglutination: Agglutination of sea urchin embryo and mouse teratoma cells by concanavalin A. Exp. Cell Res. 73, 475—480.
182. Osborn M., Weber K. (1977). The display of microtubules in transformed cells. Cell 12, 561—571.

183. Osborn M., Webster R. E., Weber K. (1978). Individual microtubules viewed by immunofluorescence and electron microscopy in the same Ptk2 cell. J. Cell Biol. 77, R27--R34.
184. Osoba D., Auersperg N. (1966). Growth of a human carcinoma of the cervix in mice thymectomized at birth. Nature (London), New Biol. 239, 83—84.
185. Ossowski L., Quiqley J. P., Kellerman G. M., Reich E. (1973). Fibrinolysis associated with transformation: Requirement of plasminogen for correlated change in cellular morphology, colony formation in agar, and cell migration. J. Exp. Med. 138, 1056—1064.
186. Ossowski L., Unkeless J. C., Tobia A., Quiqley J. P., Rifkin D. B., Reich E. (1973). An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. II. Mammalian fibroblast cultures transformed by DNA and RNA tumor viruses. J. Exp. Med., 137, 112—126.
187. Ossowski L., Biegel D., Reich E. (1979). Mammary plasminogen activator: Correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. Cell 16, 929—940.
188. Outzen H. C., Prehn R. T. (1973). Alteration of cell-mediated immunity in the mouse following administration of 4-nitroquinoline-l-oxide. Cancer Res. 33, 408—410.
189. Outzen H. C., Custer R. P. (1975). Growth of human normal and neoplastic mammary tissues in the cleared mammary fat pad of the nude mouse. J. Natl. Cancer Inst. 55, 1461—1463.
190. Owen R.B. (1976). Selective cultivation of mammalian epithelial cells. Methods Cell Biol. 14, 341—354.
191. Owens O., Gey G. O., Gey M. K. (1953). A new method for the cultivation of mammalian cells suspended in agitated fluid medium. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1, 41.
192. Ozanne B., Sambrook J. (1971). Binding of radioactively labelled concanavalin A and wheat germ agglutinin to normal and virus-transformed sells. Nature (London), New Biol. 232, 156—160.
193. Ozanne B. (1973). Variants of simian virus 40-transformed 3T3 cells that are resistant to concanavalin A. J. Virol. 12, 79—89.
194. Patterson W. B., Patterson H. R., Chute R. N. (1957). Transplantable human cancers. Cancer (Philadelphia) 10, 1281—1292.
195. Patterson W. B. (1968). Transplantation of human cancers to hamster cheek pouches. Cancer Res. 28, 1637—1651.
196. Pearlstein E. (1976). Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. Nature (London) 262, 497—500.
197. Pearlstein E., Hynes R. O., Franks L. M., Hemmings V. J. (1976). Surface proteins and fibrinolytic activity of cultured mammalian cells. Cancer Res. 36, 1475—1480.
198. Phillips B., Gazet J. C. (1970). Transplantation of primary explants of human tumour to mice treated with antilymphocyte serum. Br. J. Cancer 24, 92—95.
199. Pickard R. G., Cobb L. M., Steel G. G. (1975). The growth kinetics of xenografts of human colorectal tumors in immune deprived mice. Br. J. Cancer 31, 36—45.
200. Pledger W. J., Stiles C. A., Antoniades H. N., Scher C. D. (1977). Induction of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells by serum components: Reevaluation of the commitment process. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4481—4485.
201. Pollack R., Osborn M., Weber K. (1975). Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 994—998.
202. Pollack R., Rifkin D. (1975). Actin-containing cables within anchorage-dependent rat embryo cells are dissociated by plasmin and trypsin. Cell 6, 495—506.
203. Pollack R., Rifkin D. (1977). Modification of mammalian-cell shape. In «Proteases and Biological Control» (E. Reich, ed.), pp. 389—401. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
204. Poretz R. D., Goldstein I. J. (1970). An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and the forces involved in complexation. Biochemistry 9, 2890—2896.

205. Poste G., Reeve P. (1972). Agglutination of normal cells by plant lectins following infection with nononcogenic viruses. Nature (London), New Biol. 237, 113—114.
206. Prehn R. T., Main J. M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst. 18, 769—778.
207. Prehn R. T. (1975). Relationship of tumor immunogenicity to concentration of the oncogen. J. Natl. Cancer Inst. 55, 189—190.
208. Putman D. L., Park D. K., Rhim J. S., Huebner R. J., Ting R. C. (1977). Cellular aggregation of transformed cells: Correlation with growth in soft agar and tumorigenic potential. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 18, 156.
209. Quiqley J. P., Ossowski L., Reich E. (1974). Plasminogen, the serum proenzyme activated by factors from cells transformed by oncogenic viruses J. Biol. Chem., 249, 4306—4311.
210. Rabson A. S. Kirschstein R. (1962). Induction of malignancy in vitro in newborn hamster kidney tissue infected with simian vacuolating virus (SV40). Proc. Soc. Exp. Biol., Med. 111, 323—328.
211 Reed N. D., Manning D. D. (1978). Present status of xenotransplantation of malignant tissue to nude mouse. In «The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research» (J. Fogh and B. Giovanella, eds.), pp. 167—185. Academic Press, New York.
212. Reich E. (1974). Tumor-associated fibrinolysis. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 351—355. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor. New York.
213. Reid G. H., Gibbons J. R. (1979). The fate of cultured cells after injection into the circulation of syngeneic animals. Cancer Res. 39, 4724—4731.
214. Rein L. C. M., Shin S. I. (1978). Transplantation of heterologous endocrine tumor cells in nude mice. In «The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research» (J. Fogh and B. Giovanella, eds.), pp. 313—351. Academic Press, New York.
215. Rifkin D. B., Pollack R. (1977). Production of plasminogen activator by established cell lines of mouse origin. J. Cell. Biol. 73, 47—55.
216. Rittenhouse H. G., Fox, C. F. (1974). Concanavalin A mediated hemagglutination and binding properties of LM cells. Biochem. Biophys Res. Commun. 57, 323—331.
217. Robbins K. C., Summaria L., Hsieh B., Shah R. J. (1967). The peptide chains of human plasmin. Mechanisms of activation of human plasminogen to plasmin. J. Biol. Chem. 242, 2333—2342.
218. Romsdahl M. D., Chu E. W., Hume R., Smith R. R. (1961). The time of metastasis and release of circulating tumor cells as determined in an experimental system. Cancer (Philadelphia) 14, 883—888.
219 Rosenthal S. L., Zucker D., Davidson R. L. (1978). Dissociation of plasminogen activator from the transformed phenotype in a 5-bromodeoxyuridine dependent mutant of Syrian hamster melanoma cells. J. Cell. Physiol. 95, 275—286.
220 Rottman W. L., Walther B. T., Hellerqvist C. G., Umbreit J., Roseman S. (1974). A quantitative assay for concanavalin A-mediated cell agglutination. J. Biol. Chem., 249, 373—380.
221 Rutishauser U., Sachs L. (1975). Cell-to-cell binding induced by different lectins. J. Cell Biol. 65, 247—257.
222 Salsbury A. J. (1975). The significance of the circulating tumor cell. Cancer Treat. Rev. 2, 55—72.
223. Salzberg S., Green M. (1972). Surface alterations of cells carrying RNA tumour virus genetic information Nature (London), New Biol., 240, 116—118.
224. San R. H. C., Laspia M. F., Soiefer A. I., Marslansky C. J., Rice J.M., Williams G. M. (1979). A survey of growth in soft agar and cell surface properties as markers for transformation in adult rat liver epithelial-like cell cultures. Cancer Res. 39, 1026—1034.
225. Sandberg A. A. (1974). Chromosome changes in human malignant tumors: an evaluation. Recent Results Cancer Res. 44, 75—85.
226 Sanders F. K., Smith J. D. (1970). Effect of collagen and acid polysaccharides on the growth of BHK-21 cells in semi-solid medium. Nature (London) 227, 513—515.

227. Sanford K. K., Earle W. R., Shelton E., Schilling E. L., Duchesne E. M., Likely G. D., Becker M. M. (1950). Production of malignancy in vitro. XII. Further transformations of mouse fibroblasts to sarcomatous cells. J. Natl. Cancer Inst. II, 351—375.
228. Sanford K. K., Dunn T. B., Covalesky A. B., Dupree L. T., Earle W. R. (1961a). Polyoma virus and the production of malignancy in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 26, 331—358.
229. Sanford K. K., Dunn T. B., Westfall B. B., Covalsky A. B., Duprees L. T., and Earle W. R. (1961b). Sarcomatous change and maintenance of differentiation in longterm cultures of mouse mammary carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 26, 1139—1183.
230. Sanford K. K. (1965). Malignant transformation of cells in vitro. Int. Rev. Cytol. 18, 249—311.
231. Sanford K. K., Hoemann R. E. (1967). Neoplastic transformation of mouse and hamster cells in vitro with and without polyoma virus. J. Natl. Cancer Inst. 39, 691—704.
232. Sanford K. K., Barker B. E., Parshad R., Westfall B. B., Woods M. W., Jackson J. L., King D. R., Peppers E. V. (1970). Neoplastic conversion in vitro of mouse cells: Cytologic, chromosomal, enzymatic, glycolytic, and growth properties. J. Natl. Cancer Inst. 45, 1071—1096.
233. Schaeffer W. I., Heintz N. H. (1978). Diploid rat l'ver cell culture. IV. Malignant transformation by aflotoxin B_1. In Vitro 14, 418—427.
234. Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. (1978). Membrane proteins of cells neoplastically transformed by simian virus 40, Prog. Exp. Tumor Res. 22, 151—189.
235. Schoental R. (1967). Effects of N-methyl-N-nitrosourethane on cells in tissue culture. Nature (London) 215, 535.
236. Schrek R. (1936). Further quantitative methods for the study of transplantable tumors. Am. J. Cancer 28, 345—363.
237. Sharkey F. E., Fogh J. M., Hajdu S. I., Fitzgerald P. J., Fogh J. (1978). Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse. In «The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research» (J. Fogh and B. Giovanella, eds.), pp. 187—214. Academic Press, New York.
238. Sharon N., Lis H. (1972). Lectins: Cell agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949—959.
239. Shein H. M., Enders J. F., Levinthal J. D., Barket A. E. (1963). Transformation induced by simian virus 40 in newborn syrian hamster renewall cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 49, 28—34.
240. Shimada T., San R. H. C., Williams G. M. (1979). Quantitative markers for transformation of cultivated rat liver epithelial cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 36.
241. Shin S., Freedman V. H., Risser R., Pollack R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 4435—4439.
242. Shoham J., Inbar M., Sachs L. (1970). Different toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumour development in vivo by concanavalin A. Nature (London) 227, 1244—1246.
243. Shoham J., Sachs L. (1974). Differences in lectin agglutinability of normal and transformed cells in interphase and mitosis. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 297—304. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
244. Simpson-Herren L., Lloyd H. H. (1970). Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems. Cancer Chemother. Rep. 54, 143—174.
245. Siracky J. (1979). An approach to the problem of heterogeneity of human tumour-cell populations. Br. J. Cancer 39, 570—577.
246. Sivak A., Wolman S. R. (1972). Classification of cell types: Agglutination and chromosomal properties. In Vitro 8, 1—6.
247. Skehan P., Friedman S. J. (1975). Regulation of concanavalin A agglutination by the extracellular matrix. Exp. Cell Res. 92, 350—360.

248. Skehan P. (1976). On the regulation of cell growth in culture. Exp. Cell Res. 97, 184—192.
249. Skehan P., Friedman S. J. (1976). On the reinitiation of cell growth in culture. Exp. Cell Res. 101, 315—322.
250. Skehan P., Friedman S. J. (1978). Is cell growth inhibition density dependent? J. Supramol. Struct., Suppl. 2, 337.
251. Smets L. A., Homburg C., Van Rooy H. (1979). Selective effects of trypsinization on established and tumour-derived mouse 3T3 cells. Cell. Biol. Int. Rep. 3, 107—111.
252. Smith C. W., Goldman A. S. (1972). Effects of concanavalin A and pokeweed mitogen in vivo on mouse peritoneal macrophages. Exp. Cell Res. 73, 394—398.
253. Smith F. E. (1952). Experimental methods in population dynamics: A critique. Ecology 33, 441—450.
254. Sorenson G. D., Pettengill O. S., Cate G. C. (1978). Loss of oncogenicity and concomitant increased immunogenicity of murine plasmacytoma cell lines. Am. J. Pathol. 90, 565—581.
255. Steel G. G. (1977). «Growth Kinetics of Tumors.» Oxford Univ. Press, London and New York.
256. Steuer A. F., Hentosh P. M., Diamond L., Ting R. C. (1977). Survival differences exhibited by normal and transformed rat liver epithelial cell lines in the aggregate form. Cancer Res. 37, 1864—1867.
257. Steuer A. F., Rhim J. S., Hentosh P. M., Ting R. C. (1977b). Survival of human cells in the aggregate form: Potential index of in vitro cell transformation. J. Natl. Cancer Inst. 58, 917—921.
258. Stiles C. D., Chuman L. M., Saier M. H., Jr. (1976). Enhancement of tumorigenicity in athymic nude mice by coinjection of tumor cells and embryonic fibroblasts. J. Cell Biol. 70, 169a.
259. Stoker M., MacPherson I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. Virology 14, 359—370.
260. Stoker M., MacPherson I. (1964). Syrian hamster fibroblasts cell line BHK_{21} and its derivatives. Nature (London) 203, 1355.
261. Stiker M., O'Neill C., Berryman S., Waxman V. (1968). Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells. Int. J. Cancer 3, 683—693.
262. Stragand J. J., Hickey R. C., Bergerat J. P., Hokanson J., Drewinko B. (1979). Biological properties of a human colonic adenocarcinoma (LOVO) grown in athymic mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 141.
263. Strickland S., Beers W. H. (1976). Studies on the role of plasminogen activator in ovulation: In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. J. Biol. Chem., 251, 5694—5702.
264. Strickland S., Reich E., Sherman M. I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell 9, 231—240.
265. Takahashi M. (1915). An experimental study of metasis. J. Pathol. Bacteriol. 20, 1—13.
266. Tatsumi K., Tashima M., Shirakawa S., Nakamura T., Uchino H. (1979). Enhancement by caffiene of neocarzinostatin cytotoxicity in murine leukemia L1210 cells. Cancer Res. 39, 1623—1627.
267. Taylor J. C., Hill D. W., Rogolsky M. (1975). Purine and pyrimidine modification of growth and surface properties of baby hamster kidney cells (BHK21/C13). Exp. Cell Res. 90, 468—471.
268. Toh B. H., Qvist R., Randell V. B., Elrick W. L. (1977). Increased expression of actin-like protein in human and ethylnitrosourea-induced tumors of the nervous system. Cancer Res. 37, 4280—4284.
269. Toolan H. W. (1951). Successful subcutaneous growth and transplantation of human tumors in X-irradiated laboratory animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 77, 572—578.
270. Toolan H. W. (1953). Growth of human tumors in cortisone-treated laboratory animals: The possibility of obtaining permenantly transplantable human tumors. Cancer Res. 13, 389—394.
271. Tovey M., Brouty-Boye D. (1976). Characteristics of the chemostat culture of murine leukemia L1210 cells. Exp. Cell Res. 101, 346—364.

272. Tucker R. W., Sanford K. K., Handleman S. L., Jones G. M. (1977). Colony morphology and growth in agarose as tests for spontaneous neoplastic transformation in vitro. Cancer Res. 37, 1571—1579.
273. Tucker R. W., Sanford K. K., Frankel F. R. (1978). Tubulin and actin in paired nonneoplastic and spontaneously transformed neoplastic cell lines in vitro: Fluorescent antibody studies. Cell 13, 629—542.
274. Unkeless J. C., Tobia A., Ossowski L., Quiqley J. P., Rifkin D. B., Reich E. (1973). Enzyme function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses: 1. Chick embryo fibroblast cultures transformed by avian RNA tumor viruses. J. Exp. Med. 137, 85—111.
275. Unkeless J., Dano K., Kellerman G. M., Reich E. (1974). Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Partial purification and characterization of the cell factor, a plasminogen activator. J. Biol. Chem. 249, 4295—4305.
276. Van Nest G. A., Grimes W. J. (1974). Concanavalin A — induced agglutination and tumorigenicity in virally and spontaneously transformed cells derived from BABL/c mice. Cancer Res. 34, 1408—1412.
277. Varani J., Orr W., Ward P. A. (1979). Hydrolytic enzyme activities, migratory activity, and in vivo growth and metastic potential of recent tumor isolates. Cancer Res. 39, 2376—2380.
278. Vassalli J.-D., Hamilton J., Reich E. (1976). Macrophage plasminogen activator: Modulation of enzyme production by anti-inflammatory steroids, mitotic inhibitors, and cyclic nucleotides. Cell 8, 271—281.
279. Vlodavsky I., Sachs L. (1975). Lectin receptors on the cell surface membrane and the kinetics of lectin-induced cell agglutination. Exp. Cell Res. 93, 111—119.
280 Von Hoff D. D., Johnson G. E. (1979). Secretion of tumor markers in the human tumor stem cell system. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20,51.
281. Warren S., Gates O. (1936). The fate of intravenously injected tumor cells. Am. J. Cancer 27, 485—492.
282. Watanabe S. (1954). The metastasizability of tumor cells. Cancer (Philadelphia) 7, 215—223.
283. Weber K., Lazarides E., Goldman R. D., Vogel A., Pollack R. (1974). Localization and distribution of actin fibers in normal, transformed, and revertant cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 363—367.
284. Weinstein I. B., Ornstein J. M., Gebert R., Kaighn M. E., Standler U.-C. (1975). Growth and structural properties of epithelial cell cultures established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. Cancer Res. 35, 253—263.
285. Weiser M. M. (1972). Concanavalin A agglutination of intestinal cells from the human fetus. Science 177, 525—526.
286. Weiss L. (1967). «The Cell Periphery, Metastasis, and Other Contact Phenomena.» North-Holland Publ., Amsterdam.
287. Weiss R. A., Vesely P., Sindelarova J. (1973). Growth regulation and tumour formation of normal and neoplastic rat cells. Int. J. Cancer 11, 77—89.
288. Westermak B. (1971). Proliferation control of cultivated human glia-like cells under «steady state» conditions. Exp. Cell Res. 69, 259—264.
289. Wickus G., Gruenstein E., Robbins P. W.. Rich A. (1975). A decrease in membrane-associated action of fibroblast after transformation by Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 746—749.
290. William J. R. B. (1951). The fibrinolytic activity of urine. Br. J. Exp. Pathol. 32, 530—537.
291. Williams G. M., Elliott J. M., Weisburger J. H. (1973). Carcinoma after malignant conversion in vitro of epithelial-like cells from rat liver following exposure to chemical carcinogens. Cancer Res. 33, 606—612.
292. Willingham M. C., Yamada K. M., Yamada S. S., Pouyssegur J., and Pastan I. (1977). Microfilament bundles and cell shape are related to adhesiveness to substratum and are dissociable from growth control in cultured fibroblasts. Cell 10, 375—380.
293. Wilson E. L., Dowdle E. (1977). Plasminogen activator secretion by normal and neoplastic human tissues cultured in vitro. FEBS Symp. 47, 151—161.

294. Wolf B. A., Goldberg A. R. (1976). Rous-sarcoma-virus-transformed fibroblasts having low levels of plasminogen activator. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3613—3617.
295. Wolman S. R., Horland A. A. (1975). Genetics of tumor cells. In «Cancer» (F. F. Becker, ed.), Vol. 3, pp. 155—198 Plenum, New York.
296. Wood S. (1958). Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo in the rabbit ear chamber. Arch. Pathol. 66, 550—568.
297. Wright T. C., Ukena T. E., Campbell R., Karnovsky M. J. (1977). Rates of aggregation, loss of anchorage dependence, and tumorigenicity of cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 258—262.
298. Yahara I., Edelman G. M. (1972). Restriction of the mobility of lymphocyte immunoglobulin receptors by concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 608—612.
299. Yang N.-S., Soule H. D., McGrath C. M. (1977). Expression of murine mammary tumor virus-related antigens in human breast carcinoma (MCF-7) cells. J. Natl. Cancer Inst. 59, 1357—1367.
300. Yen A., Fried J., Clarkson B. (1977). Alternative modes of population growth inhibition in a human lymphoid cell line growing in suspension. Exp. Cell. Res. 107, 325—341.
301. Zarling J. M., Tevethia S. S. (1971). Expression of concanavalin A binding sites in rabbit kidney cells infected with vaccinia virus. Virology 45, 313—316.
302. Zimmerman M., Quiqley J. P., Asch B., Dorn C., Goldfarb R., Troll W. (1978). Direct fluorescent assay of urokinase and plasminogen activator of normal and malignant cells: Kinetics and inhibitor profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 750—753.

3

МАЛИГНИЗАЦИЯ И КЛЕТОЧНАЯ ПОВЕРХНОСТЬ

Сюзен Дж. Фридман и Филип Скехан

3.1. Современное представление о структуре и функции мембран . . . 71
3.1.1. Липиды 71
3.1.2. Белки 73
3.1.3. Молекулярная организация мембран 74
3.1.4. Динамичность мембран 76
3.2. Изменения мембран опухолевых клеток 80
3.2.1. Сиалирование гликопротеидов поверхности 81
3.2.2. Специфические сиаломуцины опухолей 89
3.2.3. Фибронектины 94
3.2.4. Гликопротеид Бромвелл — Гаррисса 99
3.2.5. Мембранные белки, индуцированные SV40 103
3.3. Исследования мембран при химиотерапии рака 105
3.3.1. Лекарственная устойчивость 105
3.3.2. Клеточные мембраны: мишени для избирательной противоопухолевой химиотерапии 107
3.4. Заключение 116
3.5. Указатель литературы 116

3.1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИИ МЕМБРАН

Мембраны представляют собой надмолекулярные структуры, образованные липидами, белками и углеводами. Фосфолипиды и белки являются главными компонентами структуры мембран. Белки составляют 60—85 % общей массы мембран.

3.1.1. Липиды

Основные липиды мембран — глицерофосфолипиды, сфинголипиды, гликолипиды и стерины. Их соотношение можно считать почти постоянным для данного типа мембраны, но варьирующим в зависимости от физиологического состояния, дифференцировки, возраста и заболевания. Различия длины, ненасыщенности, разветвленности жирнокислотных цепей определяют композиционные различия фосфолипидов и являются важнейшими детерминантами физи-

ческих свойств липидного бислоя. Изменения жирнокислотного состава является механизмом, используемым определенными типами клеток в ответ на резкие изменения окружающей среды, для быстрого изменения свойств их мембран (Harel J. R., Prosser, 1974; Goldman, 1975; Ali et al.. 1977).

Липиды взаимодействуют и связываются с теми или другими мембранными компонентами с помощью ионных, лондон — ван-дер-ваальсовых и гидрофобных сил. Одним из наиболее важных свойств липидов является их амфипатичность. Полярные и неполярные области молекул разделены в пространстве: полярные группы ориентированы в водную среду, а неполярные углеводородные цепи — кнаружи от водного окружения, образуя сердцевину бислоя.

Липиды большинства клеточных мембран упорядочены в форме бислоя, прерываемого белками, которые проникают внутрь и через сердцевину мембран (Lenard, Singer, 1966; Nicolson, 1976; Singer, Nicolson, 1972). Область мембраны, занятая продолжающимся липидным бислоем, с противоположной стороны связана с содержащимся в мембране белком (Quinn, 1976). Упорядоченность большинства, если не всех, компонентов в обеих половинах бислоя асимметрична (Steck, 1974; Steck, Dawson, 1974; Rothman, Lenard, 1977; Walsh, Crumpton, 1977). Так, белки, расположенные на наружной половине бислоя, не присутствуют во внутренней половине и наоборот. Трансмембранные белки анизотропически пронизывают бислой. Углеводные части гликопротеидов и гликолипидов ориентированы кнаружи от поверхности мембраны или ее топологических эквивалентов. Асимметрия липидов относительна, не абсолютна и определяется частично специфическим взаимодействием между молекулами липидов и асимметрически упакованными мембранными белками (Wallach, 1975).

Гликолипиды, класс мембранных липидов, которые ковалентно связаны с углеводами, представляют менее чем 1 % общих липидов клетки и плазматической мембраны (Wallach, 1975). Ганглиозиды, состоящие из нейтральных сахаров и сиаловых кислот, функционируют как рецепторы для токсинов, сайты, связывающие пептидные гормоны, лимфокины и интерферон, и как антигенные детерминанты (Der, Stanbridge, 1978). Полисиалоганглиозиды отличаются от моносиалоганглиозидов и нейтральных гликосфинголипидов их взаимодействием с фосфолипидными бислоями (Maggio, Cumar, 1978). Ди- и трисиалоганглиозиды снижают среднюю молекулярную поверхность и поверхностный потенциал фосфолипидных молекул, когда они находятся в высоком молекулярном отношении к фосфолипидам и индуцируют плавление мембран в присутствии кальция. Холестерин — основной стерин в мембранах клеток животных. Находится главным образом в неэтерифицированной форме, хотя наибольшее количество эфиров холестерина обнаружено в микросомальных и других внутриклеточных мембранах (Sabine, 1977). Молярное отношение холестерин : полярные липиды варьирует в различных клеточных мембранах. В плазматических мембранах его значение наибольшее и достигает приблизительно 1, тогда как в митохондриальных мембранах — наименьшее, около 0,1 (Quinn, 1976; Sabine, 1977; Wal-

lach, 1975). Результаты исследования, проведенного на модельных липидных бислоях и естественных мембранах, показали, что холестерин может необычно располагаться в бислое (Darke et al., 1972; de Kruyff et al., 1974; Phillips, Finer, 1974). Холестерин ограничивает молекулярное движение жирнокислотных цепей в жидкокристаллическом состоянии бислоя, взаимодействует с цепями, упаковывая их, переводит бислой в состояние геля и уменьшает кооперативность фазового перехода из геля в жидкокристаллическое состояние в смесях фосфолипиды / холестерин (Oldfield, Chapman, 1972). Модификация уровня холестерина значительно изменяет проницаемость модельных липидных бислоев для ионов и небольших молекул и влияет на активность мембраносвязанных ферментов (Wallach, 1975; Kimelberg, 1977). Аномальный уровень клеточного холестерина обнаружен при атеросклерозе, разрушении эритроцитов, опухолях (Papahadjopoulos, 1974; Cooper, 1977; Sabine, 1977).

3.1.2. Белки

Мембранные белки очень разнообразны структурно и функционально. Они выполняют каталитические и транспортные функции, являются медиаторами лиганд-рецепторных взаимодействий и участвуют в иммунологических процессах. По своему белковому составу мембраны различаются как качественно, так и количественно. Некоторые мембраны содержат сотни белков (Guidotti, 1972; Quinn, 1976; DePierre, Ernster, 1977). Наборы ферментов клеточных мембран отличаются, и это используется для идентификации изолированных субклеточных мембранных фракций и органелл. Предположение, что белки, которыми особенно богаты клеточные мембраны, связаны только с этими мембранами, не обоснованно. Следует обратить внимание на использование ферментативных маркеров как единственного критерия для идентификации неизвестных мембранных фракций (DePierre, Ernster, 1977; Evans, 1978; Morze et al., 1979).

Мембранные белки связаны нековалентно с мембранным матриксом. Силы этих связей варьируют от слабых к сильным. Белки, чьи взаимодействия с мембранами преимущественно электростатические, или полярные, легко экстрагируются растворами с высокой ионной силой и с помощью хелатирующих ионы агентов. Они получили название периферических белков. Белки, встроенные в бислой, чьи взаимодействия стабилизированы главным образом лондон — ван-дер-ваальсовыми и гидрофобными силами, экстрагируются из мембран с трудом и требуют применения детергентов, хаотропных агентов или органических растворителей. Эти стойкие белки обозначаются как «интегральные» мембранные белки (Capaldi, Vanderkooi, 1972; Singer, Nicolson, 1972). Трансмембранные белки объединяют бислой и могут взаимодействовать с молекулами, расположенными на внутренней и наружной поверхностях мембран. Трансмембранные звенья поверхностных рецепторов с периферическими компонентами, внутренней и наружной поверхностями мембран и со структурами цитоскелета могут функционировать в стабилизированных или перерас-

пределяющихся поверхностных гликопротеидах (Nicolson et al., 1977).

Амфипатические характеристики мембранных белков могут быть обусловлены в одних случаях наличием линейных последовательностей гидрофобных аминокислот в первичной полипептидной структуре, а в других — конформационных перераспределений полярных и неполярных остатков внутри мембран (Wallach et al., 1975).

Многие интегральные мембранные белки ковалентно присоединены к углеводам. Число и длина прикрепленных олигосахаридных цепей варьируют и частично определяются их способностью связываться с аминокислотами (аспарагином, серином, треонином), последовательностью аминокислот в акцептирующей области и соответствующей конформацией углеводных цепей, в частности конформацией β-цепей (Spiri, 1973; Marshall, 1974; 1979; Aubert et al., 1976; Beeley, 1977; Kronquist, Lenarr, 1978). Олигосахаридные цепи могут существовать во множестве изометрических форм, зависящих от числа различных сахаров, их оптической конфигурации (α и β) и специфических цепей, связывающих индивидуальные остатки сахаров. Наиболее часто в гликопротеидах встречаются такие сахара, как L-фукоза, D-манноза, О-галактоза, *N*-ацетил-*P*-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин, редко D-глюкоза и сиаловые кислоты. Установлено, что трисахариды, содержащие только три различных типа сахаров, могут существовать в более чем в 1000 изомерических формах (Clamp, 1974). Известен состав олигосахаридных последовательностей гликопротеидов мембран, которые содержат в среднем семь углеводных остатков на цепь (Wallach, 1975; Walborg, 1978).

Олигосахаридные головные группы гликопротеидов принимают участие в разнообразных биологических распознавательных процессах, среди которых взаимодействия антиген — антитело, гормон — рецептор и клеточные контактные взаимодействия (Hughes, 1976). Более полное понимание структурной основы углеводной специфичности бесспорно придет из детального анализа структур и конформаций олигосахаридных частей мембранных гликопротеинов. В настоящее время пользуются информацией по изучению связывания лектинов с гетеросахаридами определенных структур. Лектины, полученные из различных растительных и животных источников, распознают специфические последовательности моносахаридов, которые, по-видимому, необходимы для высокородственных связывающих взаимодействий (Lis, Sharon 1973; Goldstein, Hayes, 1978; Kornfeld, Kornfeld, 1978). Лектины, находясь на клеточной поверхности, являются посредниками специфического поглощения гликозилированных макромолекул, процесса, который включает распознавание определенных остатков сахаров в олигосахаридных частях молекул (Ashwell, Morell, 1974; Kaplan et al., 1977; Neufeld et al., 1977).

3.1.3. Молекулярная организация мембран

Современные концепции на молекулярную организацию липидов и белков в биологических мембранах базируются на следующих фактах: 1) молекулы белков локализируются не только на поверхно-

сти мембран, но и пронизывают бимолекулярный липидный слой; 2) липиды и белки не жестко расположены в определенных позициях в мембранном матриксе, а являются высокоподвижными и гибкими и 3) физические свойства мембранных липидов могут значительно влиять на активность мембранных белков.

Две фундаментально различные точки зрения на структуру мембран широко обсуждаются в литературе приблизительно десять лет: жидкостно-мозаичная модель (Singer, Nicolson, 1972) и доменная (латексная), или, как ее еще называют, модель липопротеидного ковра (Changeux et al., 1967; Changeux, Thiery, 1968; Jain, White, 1977). Главное различие этих двух моделей заключается в степени подвижности мембранных компонентов.

Жидкостно-мозаичная модель, основательно описанная Singer и Nicolson (Singer, Nicolson, 1972) в 1972 г., рассматривает мембрану как жидкий липидный бислой, на котором адсорбированы или встроены белки и через который липиды и белковые компоненты движутся свободно, а значит, распределяются случайно. Свободная подвижность мембранных компонентов ограничивается их обоюдным взаимодействием и связями с периферическими белками и элементами цитоскелета. Допускается, что этих механизмов достаточно для образования постоянных областей с жидким бислоем и поддержания таким образом широкого разнообразия структурной дифференцировки (Franken, Kartenbeck, 1976), характерной для естественных мембран. Жидкостно-мозаичная модель не допускает многоэтапных взаимодействий, которые лежат в основе кооперативного поведения многих типов мембран (Wallach, 1975, 1977).

Латексные модели (Changeux et al., 1967; Changeux, Thiery, 1968), предполагают, что мембраны состоят из повторяющихся рядов липопротеиновых субъединиц. По аналогии с регуляцией активности ферментов эти мембранные субъединицы должны находиться в двух структурных взаимопревращаемых состояниях. Переход из одного состояния в другое включается с помощью различных механизмов, а именно: присоединения двухвалентных катионов, иона водорода, небольших молекул и изменений температуры, мембранного потенциала (Changeux et al., 1967; Chongeux, Thiery, 1968; Hill, 1967; Trauble, Metcalfe, 1975). Кооперативность возникает путем гомологичного взаимодействия между соседними субъединицами, запускающего механизм, благодаря которому местные перестройки могут быть переданы и усилены через большие области мембраны.

В противоположность модели, предложенной Changeux (1967), в которой рассматриваются мембраны как вытянутый двухмерный кристаллический каркас, стабилизированный в плоскости в основном белок-белковыми взаимодействиями, Jain, White (1977) рассматривают мембраны как набор относительно жестких пластиноподобных структур, содержащих липиды и липид-белковые образования, связанные и существующие в равновесии с жидкими областями бислоя.

Каждая из этих моделей обеспечивает многоступенчатую упаковку в биомембранах и способна объяснить различные мембранные феномены, которые несовместимы с жидкостно-мозаичной моделью.

Проведенное обсуждение современных представлений о структуре мембран необходимо для использования их в рамках концепций на будущие эксперименты. В связи с этим все модели, которые были предложены с середины 1960 г., могут помочь нам понять молекулярную организацию биологических мембран.

3.1.4. Динамичность мембран

3.1.4.1. Текучесть мембран

Короче говоря, «текучесть» — показатель, оценивающий способность жидкости к текучести. В литературе по биологическим мембранам, однако, термин «текучесть мембран» используется для обозначения молекулярных и внутрицепочечных движений фосфолипидов, возникающих тогда, когда нарушается влияние когезивных сил между близко упакованными и в высокой степени упорядоченными фосфолипидами бислоя в фазе геля. Липиды могут существовать в двух состояниях: кристаллическом (гель) и жидкокристаллическом. В фазе геля все перемещающиеся углеводородные цепи фосфолипидов плотно упакованы в гексагональные упорядоченные образования, а их вращательные и продольные перемещения ограниченны. В течение эндотермического перехода из фазы геля в жидкокристаллическое состояние углеводородные цепи подвергаются одномоментному плавлению, в результате чего возрастают частота вращения их связей углерод—углерод, изомеризация (*транс*-гауче), а также осцилляция этих цепей относительно оси, перпендикулярной к плоскости бислоя. Изомеризация *транс*-гауче жидких углеводородных цепей появляется с большой частотой (10^9—10^{10} $с^{-1}$). Если при этом происходит вращение обеих цепей в противоположном направлении, около *транс*-связей образуется петля, которая быстро передвигается вверх и вниз по углеводородной цепи со скоростью 10^5 $см^2$ $с^{-1}$.

Полярные группы фосфолипидов в жидком бислое сохраняют свою квазикристаллическую упаковку, в то время как жирнокислотные цепи становятся в высшей степени неупорядоченными по мере приближения к центру бислоя (Hubbel, McConnell, 1971; Trauble, Sackmann, 1972; Seeling, Niederberger, 1974).

Переход бислоя из состояния геля в жидкокристаллическое и обратно наступает при более высоком значении температуры, характерном для каждого вида фосфолипидов в отдельности, и определяется главным образом структурными характеристиками жирнокислотных цепей, этерифицирующими в 1- и 2-положении основания глицерина. Увеличение длины цепи и насыщенности снижает ионизацию полярных групп, приводя к увеличению средней температуры перехода T_1, тогда как укорочение цепи, увеличение ненасыщенности и поверхностной площади заряда и включение в бислой различных органических амфипатических молекул приводят к снижению T_1. Переход гель — жидкокристаллическое состояние развивается в бислое в латеральном направлении и приводит к сокращению толщины бислоя (Fox, 1975).

Фосфолипиды биомембран по отношению к их жирнокислотному составу гетерогенны, и это определяет сложное поведение фазовых переходов. Множественные полные фазовые переходы, сопровождающиеся неидеальным поведением, свидетельствуют, что бислой липидов при физиологических значениях температуры содержит области липидов, находящихся в твердом (гелеобразном) и жидкокристаллическом состояниях (Phillips et al., 1972; Linden et al., 1973; Lee, 1977). Переход гель — жидкокристаллическая фаза может быть индуцирован путем изменений температуры или pH и поверхностного потенциала в физиологических условиях, а также с помощью двухвалентных катионов различных органических молекул, включая анестетики (Trauble, Eibl, 1974; Papahadjopoulos, Poste, 1975; Jacobson, Papahadjopoulos, 1975).

Кооперативность липидных фазовых переходов, которая, как предполагают, важна для функционирования определенных мембрансвязанных ферментов и транспортных белков, может быть снижена или ликвидирована с помощью холестерина (Ladbrooke et al., 1968; Oldfield, Chapman, 1972; Papahadjopoulos et al., 1973; 1973a), интегральных мембранных белков (Papahadjopoulos et al., 1975, Jadobson, Papahadjopoulos, 1975).

В дополнение к описанным типам движений липидов их молекулы могут быстро перемещаться на поверхности мембраны с коэффициентом диффузии в пределах от 10^{-7} до 10^{-9} см · $с^{-1}$ (детально приведено в работе Jain, White, 1977). Однако поперечное перемещение молекул с одной половины бислоя к другой происходит со значительно меньшей скоростью. В модельных липидных бислоях полупериод липидных превращений находится на временной шкале в интервале от часов до суток (Kornberg, McConnell, 1971; McNamee, McConnell, 1973; Lenard, Rothman, 1976; McNamee, McConnell, 1973; Grant, McConnell, 1973; Smith, Green, 1974), тогда как в природных мембранах он измеряется минутами. Эти факты побудили к предположению, что поперечные движения липидов через естественную мембрану могут ускоряться с помощью специфических белков (Bretscher, 1974). Представление о том, что большинство липидов движется свободно и распределяется случайно в плоскости бислоя, является сверхупрощением и критикуется на методической основе (Wallach, 1975; 1977; Jain, White, 1977). Особенно много экспериментов выполнено с использованием спин-меченых аналогов липидов, которые дали представление о характеристиках текучести липидного бислоя. Поведение этих зондов отличалось от такового природных фосфолипидов в связи с появлением областей с большей, чем обычно, текучестью с нарушением нормальной геометрии упаковки жирнокислотных цепей липидов в их непосредственном окружении. Скорость обмена молекулярных зондов с соседними фосфолипидами может быть отличной от скорости латерального перемещения липидов в невозмущенных областях бислоя.

Из-за такой неопределенности полученные с помощью этих методов данные об ограничении подвижности липидов в природных мембранах и липидных бислоях могут быть несколько завышены.

Гетерогенность структуры липидного бислоя доказана рядом экспериментов. Вновь синтезируемые липиды неоднотипно распределяются в мембранах экспоненциально растущих бактерий (Morrison, Morowitz, 1970). Отрицательно заряженные виды липидов образуют кластеры в смешанных фосфолипидных бислоях в присутствии Ca^{2+} (Ohnishi, Ito, 1973; Papahadjopoulos, 1975) и положительно заряженных белков (Galla, Sackmann, 1975; Birrell, Griffith, 1976). Интегральные мембранные белки и холестерин сдерживают движение и перераспределение упорядочивающихся липидов в их непосредственном окружении (Oldfield, Chapman, 1972; Papahadjopoulos et al., 1975; Wallach et al., 1979).

3.1.4.2. Подвижность белков

Одним из принципов жидкостно-мозаичной модели является то, что белки свободно перемещаются в плоскости (горизонтально) бислоя. Большинство выводов относительно горизонтального перемещения белков основано на измерениях скорости перемещения поверхностных антигенов при индуцированном вирусом слиянии различных типов клеток (Watkins, Grace, 1967; Frye, Edidin, 1970), перераспределении поверхностных рецепторов лектинов и иммуноглобулинов, которые определялись в результате связывания с их флюоресцеин- или ферритин-мечеными лектинами и антителами (Taylor et al., 1971; Karnovsky et al., 1973; Raff, DePetris, 1973) и повторным появлением поглощения хромофоров белков, подверженных фотообесцвечиванию в ограниченных областях мембран (Peters et al., 1974; Poo, Cone, 1974). Вращательное движение регистрировалось спектроскопически путем измерения скорости затухания фотодихроизма и определения времени вращательной релаксации хромофор-носящих белков (Cone, 1972; Junge, 1972; 1973; Razi-Naqvi et al., 1973; Cherry et al., 1977).

Результаты таких экспериментов позволяют предполагать, что некоторые, но не все, мембранные белки обладают высокой подвижностью и подвергаются как горизонтальному, так и вращательному перемещению в бислое. Однако прямых доказательств диффузии белков в пределах бислоя еще не получено.

3.1.4.3. Липид-белковые взаимодействия

Текучесть бислоя влияет на активность многих мембран-связанных ферментов и транспорт белков (Raison, 1973; Kimelberg, 1977). Ее изменения могут быть вызваны экспериментально с помощью различной температуры или модификации липидного состава естественных мембран или липид-зависимых ферментов. Резкие изменения энергии активации фермента и транспортных реакций (определенные по наклонам графиков Аррениуса) часто совпадали с температурой фазовых переходов липидов мембран. Они появлялись при таких значениях температуры, которые вызывают горизонтальное фазовое разделение мембранных липидов (Fox, 1975). Вероятно, ответ мемб-

ранных белков на текучесть липидов непосредственно отражает зависимость липидов от конформации белка или изменения поверхностных свойств бислоя, которые, в свою очередь, влияют на такие свойства мембранных белков, как гидратация, ионизация, концентрация двухвалентных ионов и поверхностный потенциал.

Исследование активности ферментов одних и тех же мембран в зависимости от изменения температуры показало, что не все белки были в идентичном липидном окружении; обнаружено, что разрывы на графиках Аррениуса наступали при разных значениях температуры для различных ферментов одних и тех же мембранных систем (Kimelberg, 1977). Селективность упорядоченности липидов вблизи интегральных мембранных белков рассматривается как возможный механизм изоляции белков в уникальном липидном окружении. Выдвинуты предположения, что интегральные мембранные белки окружены иммобилизированной липидной оболочкой, чья структура и химический состав необходимы для поддержания активности мембранных белков (Jost et al., 1973; Hesketh et al., 1976; Houslay et al., 1976; Metcalfe, Warren, 1977). В настоящее время понятие «связанные липиды» является очень спорным и не установленным фактом (Chapman et al., 1979). Эти предположения возникли на основании результатов нескольких разнотипных экспериментов, которые вкратце суммированы ниже.

Когда интегральные белки экстрагировались из их липидного окружения, ферментативная активность часто исчезала или значительно уменьшалась. Чтобы полностью восстановить ферментативную активность, необходимо добавить минимальное количество липидов. Для некоторых ферментов требуются специфические липиды (Cunningham, Hager, 1971; Fourcans, Jain, 1974; Gazzotti et al., 1975; Ernster et al., 1977; Nicolson et al., 1977; Agnew, Raftery, 1979).

Интегральные белки могут изменять состояние структурной организации липидов в бислое, увеличивая упорядоченность их жирнокислотных остатков или уменьшая ее, что сопровождается повышением или понижением значений T_1 (Wallach et al., 1979). Встраивание белков в модельный липидный бислой снижает кооперативность липидных фазовых переходов, что приписывается упорядоченности липидных молекул, прилегающих к белкам, которые предохраняют их от участия в кооперативном плавлении части липидов в бислое (Papahadjopoulos et al., 1975). На основании исследований лазерной рамановской спектроскопии Wallach и соавт. (1979), предположили, что интегральные белки окружены связанным с ними липидным градиентом, в котором текучесть липидных цепей увеличивается по мере удаления от периметра молекулы белка. Свойства связанных липидов интенсивно изучались на липид-зависимых ферментах. Получены противоречивые результаты, зависящие от конкретных методов, которые использовались для исследования показателей текучести липидного окружения мембраносвязанных ферментов (Chapman et al., 1979). Например, спектральные характеристики ЭПР спин-меченых жирных кислот, включенных в смесь цитохромоксидаза — лецитин, показали, что связанные липиды более высокоупоря-

доченны, чем чистый лецитин, потому что в результате связывания последнего с ферментом повышается температура его фазового перехода (Jost et al., 1973; Chapman et al., 1979), сопутствующая состоянию липидов в фазе геля. Однако спектры дейтериевого ядерного магнитного резонанса показали, что метиловые группы лецитина менее упорядочены в связанных липидах, о чем говорит наличие как повышенного, так и пониженного значения T_1 для лецитина (Chapman et al., 1979; Kang et al., 1979).

Неоднозначные результаты получены при изучении Ca^{2+}-АТФазы саркоплазматического ретикулума. Hesketh и соавт. (1976) представили доказательства существования липидных «колец», состоящих из 30 фосфолипидных молекул, приходящихся на молекулу фермента. Кольцевые липиды изменяются по сравнению с липидами бислоя приблизительно в 5000 раз медленнее, чем ожидалось на основании данных свободного горизонтального перемещения липидов (Metcalfe, Warren, 1977). Более того, требуется минимум 30 молекул фосфолипидов на молекулу АТФазы для максимального восстановления АТФазной активности. То, что кольцевые липиды обладают отличающимися от липидов бислоя показателями текучести, доказывается данными спектров спин-зондов, которые получены при изучении различных соотношений липид/белок и из данных, свидетельствующих о сохранении активности АТФазы при значениях температуры ниже значений температуры фазового перехода для липидов бислоя (Hesketh et al., 1976; Metcalfe, Warren, 1977). В противоположность этим результатам данные по исследованию этих же систем с помощью ^{2}H-ЯМР не обнаруживают иммобилизацию липидов при значениях температуры выше значения T_1 для липидов бислоя (Chapman et al., 1979).

Большинство ЭПР-исследований, которые доказывали иммобилизацию липидов в близости интегральных белков, выполнено при исключительно высоком соотношении белок/липид. Недавно были получены убедительные доказательства, что связанные липиды могут существовать в бислое липидов, когда они попадают в области, богатые белками, и таким образом предохраняться от участия в фазовых переходах липидов, происходящих в областях мембраны, относительно свободных от таких белков (Chapman et al., 1979).

3.2. ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Злокачественные новообразования называют болезнями клеточных мембран (Wallach, 1976). Отклонения от нормального типа мембран в опухолевых клетках так многочисленны и разнообразны, что кажется резонным предположить поиск их общей основы. Базируясь на современных знаниях о структуре и составе мембран, Wallach и соавт. (1975, 1976) полагают, что изменения соотношения липидов, содержания холестерина, встраивания анормальных белков и связывания лигандов — все это возможные механизмы перестройки структуры мембран, которые могут объяснить многочисленность фенотипических изменений опухолевых клеток.

Проведено множество сравнительных исследований свойств мембран нормальных и опухолевых клеток, трансформированных и нетрансформированных клеточных линий и различных опухолей человека и животных (исчерпывающие обзоры см. у Wallach, 1975; Fishman, Brady, 1976; Nicolson, 1976; Wallach, 1977; 1978; Stoddart, 1979). Рассмотрен фактически каждый аспект состава и функции мембран, который мог быть проанализирован. Но еще остается не ясным биологическое значение и отношение к трансформации нормальных клеток в опухолевые этого множества описанных интересных фактов. Медленное движение вперед в этой области объясняется неадекватностью современных моделей поведения злокачественных клеток in vitro (гл. 1), сложностью клеточного состава опухолей in vivo, малочисленностью глубоких исследований взаимосвязи выявленных аномалий в мембранах и отклонений от нормы поведения популяций опухолевых клеток при взаимодействии с клетками нормальных тканей.

В последние годы мы являемся свидетелями возрастающего использования хорошо апробированных физических методик в исследованиях тонких свойств мембран. В дополнение к этому развиваются методы для выделения различных опухолевых клеток с измененным составом клеточной поверхности (Gottlieb et al., 1975; Meager et al., 1975; Stanley et al., 1975; 1975, 1977), характером метастазирования (Fidler, 1973) и чувствительностью к цитотоксическому действию иммунной системы (Fidler et al., 1976; Talmadge et al., 1979). Использование этих селективных методик в комбинации с методами генетики соматических клеток может дать мощный инструмент для выяснения роли изменений мембран в малигнизации клеток (Bramwell, Harris, 1978).

Целью настоящего обзора не является исчерпывающее перечисление огромной литературы, которая в настоящее время существует в биологии мембран опухолевых клеток. Мы хотели сосредоточить внимание на изменениях в мембранах гликопротеидов, их вероятном отношении к превращению нормальных клеток в злокачественные. Будут обсуждены возможности применения основных результатов в диагностике и лечении злокачественных новообразований.

8.2.1. Сиалирование гликопротеидов поверхности

Проведено сравнение степени распределения фукозо- и глюкозамин-меченых гликопептидов в нормальных и малигнизированных лимфоцитах (VanBeek et al., 1975), нормальных тканях мышей и меланомах B16 (Warren et al., 1975), а также в вариантах меланом, отобранных из периферических метастазов легких (Fidler, 1973; Warren et al., 1975), стабильных клеточных линий и полученных из них производных, трансформированных спонтанно, вирусами и химическими факторами (см. обзоры Warren et al., 1977; 1979; Glick, Flowers, 1978).

Перед обсуждением этих работ необходимо отметить, что большинство исследований продолжает еще относиться к стабильным

клеточным линиям,таким, как 3Т3 и ВНК, к нетрансформированным немалигнизированным клеткам, хотя хорошо известно, что эти клетки вызывают опухоли. Другие стабильные клеточные линии, которые не проверялись in vivo на опухолеобразование, в лабораториях, где они выращивались, использовались для биохимических исследований. Поэтому эти линии нельзя точно отнести к нормальным или к малигнизированным. Клетки культур, которые считаются трансформированными, что было установлено по изменению их морфологии, поведению роста в агаре, не могут относиться к опухолеобразующим, так как эти характеристики строго не коррелируют с опухолеобразованием (гл. 2). В большинстве исследований не было проведено анализа на опухолеобразование.

Доступные к действию трипсина гликопептиды поверхностных и внутренних мембран опухолевых и предполагаемых трансформированных клеток при колоночной хроматографии на сефадексе G-50 разделяются на два пика. Каждый пик гетерогенен и может быть в дальнейшем расфракционирован на множество гликопептидов (Glick, 1974). Фракции, которые элюируются первыми при гельфильтрации на колонках, обычно содержат бóльшие, более разветвленные, чем фракции, элюированные позднее, олигосахаридные цепи (Glick, 1974; Ogata et al., 1976) и обогащенные общими нейраминидазочувствительными остатками сиаловых кислот (Warren et al., 1977). Поверхностные гликопептиды немалигнизированных тканей и клеточных линий, которые относятся к нетрансформированным, в отличие от гликопептидов малигнизированных тканей выходят при хроматографии одним пиком, содержащим олигосахаридные цепи (небольших размеров), остатки сиаловых кислот которых защищены от действия нейраминидазы (Warren et al., 1977).

Предполагается, что обогащение сиаловыми кислотами гликопептидов — характерная особенность трансформированных клеток (Van Beek et al., 1973; Warren et al., 1975, 1977; Warren et al., 1975; 1977). Противоречивые данные, полученные в нескольких лабораториях, дают возможность считать это предположение чрезмерно обобщенным. Быстрорастущие W1-38 клетки имеют гликопептидный состав, характерный для трансформированных клеток, хотя их онкогенная трансформация не была обнаружена (Ceccarini, 1975). В дополнение к этому оказалось, что не все клетки в трансформированных культурах содержат высокий уровень сиалогликопептидов, хотя в некоторых случаях при перевивке этих клеток животным возникали и росли опухоли (Glick et al., 1973). Сходные изменения обнаружены и на ранних пассажах опухолевых клеток (Shiu et al., 1977).

Обогащение сиаловыми кислотами, по-видимому, не связано с другими фенотипическими признаками, которые описаны для трансформированных клеток, растущих in vitro, включая изменения поведения роста (Glick et al., 1973; Smets et al., 1976) и состава клеточной поверхности (Lage-Davila et al., 1979). Увеличение активности специфических ферментов — сиалилтрансфераз сопутствовало появлению повышенного количества сиалогликопептидов в быстрорастущих нетрансформированных и трансформированных клеточных куль-

турах (Warren et al., 1972). Сиалилтрансферазы находятся на поверхности клетки и мембран эндоплазматического ретикулума. Они катализируют перенос сиаловых кислот на десиалинизированные эндогенные акцепторы. Ввиду того что данные, представленные большинством исследователей, о содержании и активности сиалилтрансфераз получены с использованием экзогенных акцепторов, содержание которых часто снижается в процессе трансформации (Wu et al., 1969; Grimes, 1970; 1973; Makita, Seyama, 1971), кажется вероятным, что трансформационно- и ростзависимое увеличение сиалогликопептидов происходит только в небольшой популяции гликопептидов мембран в связи с появлением специфических сиалилтрансфераз, описанных Warren и сотрудниками (Warren et al., 1972).

При оценке возможной взаимозависимости увеличения сиалирования гликопептидов и онкогенной трансформации или малигнизации необходимо учитывать ограничения и артефакты методик, вид получаемой информации. В большинстве случаев клетки метаболически метились введением за один или более дней радиоактивных глюкозамина или фукозы. В дальнейшем меченые поверхностные гликопептиды выделялись из интактных клеток мягкой трипсинизацией, подвергались жесткой обработке проназой, удаляющей все, кроме нескольких аминокислот, и анализировались с помощью гель-фильтрационной хроматографии, распределяющей олигосахаридные цепи по размерам. Артефактные изменения в гликозилированных образцах могут возникать в связи с неправильным выбором условий для включения метки и трипсинизации, использованием клеток, находящихся в различных пролиферативных состояниях. Количественные и качественные нарушения включения меченых сахаров в гликопептиды могут возникать в результате изменений клеточных систем, взаимопревращения сахаров или обобщения размеров эндогенносинтезированных нуклеотидных сахаров (Gurchenco et al., 1978). Всякий раз при проведении сравнительных исследований клеток, пребывающий в различных физиологических и патологических состояниях, и обнаружении различий их меченых образцов необходимо было бы учитывать, что эти различия могут быть обусловлены метаболизмом сахаров. К сожалению, такого типа анализ не проводился в большинстве исследований, представленных в литературе. Для того чтобы максимально пометить гликопептиды и избежать артефактов, связанных с неустойчивым состоянием процесса включения метки, культуры клеток инкубировали с мечеными сахарами от одного до нескольких дней. Для многих типов культивируемых клеток скорость роста популяции не может оставаться постоянной в течение периода включения метки (Skehan, 1976; Skehan, Friedman, 1979; 1980).

Не было обнаружено влияние скорости роста на состав и структуру гликопептидов в нескольких исследованиях, представивших данные о сравнении растущих и нерастущих культур. В связи с ростом найдены изменения количества сиаловых кислот в фукозосодержащих гликопептидах (Warren et al., 1972; Glick, Buck, 1973; Buck et al., 1974), структуры олигоманнозильных ядер нейтральных

гликопептидов (Ceccarini et al., 1975) и хроматографического поведения кислых гликопептидов, которые возникали из-за структурных изменений, не связанных с содержанием сиаловых кислот олигосахаридных цепей (Ceccarini et al., 1975).

Не ясно, связаны ли обнаруженные изменения гликопептидов «растущих» трансформированных клеток (по сравнению с нетрансформированными) с собственно трансформацией в большей степени, чем с процессами роста. Некоторые авторы предложили использовать для выяснения этого вопроса экспоненциально растущие клетки в исследованиях с включением метки и биохимическим анализом. Справедливо, что при определенных условиях кинетика роста ряда клеточных линий млекопитающих отвечает экспоненциальному закону. Многие другие линии клеток подчиняются этому закону (Skehan, 1976; Skehan, Friedman, 1979, 1980). У них скорость роста популяции изменяется постоянно в течение всего периода роста популяции. Сомнительна обоснованность сравнения культур, ростовые характеристики которых не изучены, особенно, если учитывать, что существенные изменения на клеточной поверхности могут происходить в течение клеточного цикла (Pardee, 1975), а изменения скорости роста популяции отражают изменения распределения времени генерации клеток в популяции (Skehan, Friedman, 1979). Это можно избежать, если сравнивать метаболическое состояние растущих культур с таковым «нерастущих культур». Общая скорость роста популяции может снижаться по различным причинам, среди которых — истощение питательных веществ в среде, смерть клеток, уменьшение ростовых фракций, снижение скорости прохождения по клеточному циклу и увеличение доли медленно растущих субпопуляций клеток, влияние объема и состава среды, плотности клеток и прикрепления их к поверхности чашек. В исследованиях необходимо учитывать эти факторы и соответственно умело обращаться с ними, следить, чтобы биохимические сравнения клеточных популяций проводились при одинаковом состоянии их роста.

Предположения, что некоторые изменения поверхности опухолевых клеток связаны с началом их роста, основанные на использовании «экспоненциально растущих» клеточных культур как моделей для изучения связи изменений поверхности с «утратой контроля за ростом», недостаточно обоснованны. Опухоли млекопитающих редко имеют кинетику роста, подчиняющуюся экспоненциальному закону (Laird, 1969; Simpson-Herren, Lloyd, 1970; Steel, 1977). Их рост в большинстве случаев обычно замедляется, поэтому более рационально использовать в исследованиях клеточные культуральные системы, которые имеют такого рода характеристики роста (Skehan, 1976; Skehan, Friedman, 1979; 1980).

Гель-фильтрационный анализ продуктов, полученных после обработки клеточной поверхности трипсином, является быстрым и удобным методом для отбора самых различных клеток и тканей при определении изменений наборов гликопептидов, дающим, однако, очень малую дополнительную информацию о количестве измененных гликопротеидов мембран или о структурной основе наблюдаемых

изменений (Cook, 1976). Набор образцов гликопептидов, получаемый этим методом, включает только те гликопротеиды, которые обладают белковыми связями, чувствительными и доступными для протеолиза.

Обработка трипсином может приводить к преимущественному отщеплению от одного белка нескольких цепей сахаров, тогда как другие остаются нетронутыми (Marchesi et al., 1972). Более того, гликопептиды, полученные после обработки трипсином интактных клеток, могут отличаться от гликопептидов, полученных после обработки трипсином плазматических мембран, выделенных из этих клеток, как это продемонстрировано в работах Glick и Buck (1973) при исследовании действия винбластина на гликопептиды поверхности клеток ВНК.

При сравнении продуктов трипсинизации клеток, остановленных и не остановленных в метафазе обработкой винбластином, оказалось, что остановленные клетки имели набор продуктов, характерный для трансформированного состояния, а неостановленные — для нормального состояния. Эти различия не наблюдались при сравнении обработанных трипсином плазматических мембран, выделенных из этих клеток. Обе клеточные популяции содержали трансформированный тип гликопептидов. Другой артефакт связан с трипсинизацией клеточной поверхности, в ходе которой загрязняются производные гликопептидов поверхности внутриклеточным материалом, включающим немембранные гликопротеиды, освобождающиеся при протеолизе поверхности клеток (Jett, Jamieson, 1973). Невозможно определить молекулярную основу наблюдаемых изменений в наборах гликопептидов, используя только гель-фильтрационный хроматографический анализ, так как размеры и геометрия углеводных цепей оказывают значительное влияние на вытесняемый гликолизированной молекулой объем (Jackson, Seaman, 1972). Для детального структурного анализа олигосахаридов требуется количество чистых гликопептидов, выраженное в миллиграммах. В очень немногих исследованиях сделаны попытки связать хроматографическое поведение гликопептидов поверхности с основными структурными изменениями углеводных компонентов (Glick, 1974; Glick, Flowers, 1978; Ceccarini, 1975; Ceccarini et al., 1975; Ogata et al., 1976).

3.2.1.1. Изменение компонентов, содержащих сиаловые кислоты в клетках метастазирующих опухолей

Метастазирование — сложный биологический процесс, который возникает в растущих in vivo опухолях (Weiss, 1967; 1977; Fidler, 1975; Willis, 1973), не происходит при росте in vitro и не может быть воспроизведен в культурах опухолевых клеток. Однако можно изучать специфические аспекты этого процесса в соответствующих системах клеточных культур, которые способны метастазировать при перевивке животным (Ladbrooke et al., 1968; Nicolson et al., 1977). По этим причинам все еще не ясно, почему определенные опухолевые клетки преимущественно приживаются и растут в специфических органах хозяина. Исследования Fidler, проведенные на меланоме

мышей B16, показали, что клетки из первичной опухоли отличаются друг от друга способностью к избирательному метастазированию в легкие (Fidler, Kripke, 1977).

С помощью повторных пассажей клеток меланомы, полученных из метастатических узлов легких сингенных мышей C57 BL/6, in vitro и in vivo были выделены различные линии с высокой и низкой способностью метастазировать в легкие. Эти клетки, обозначенные соответственно как F_{10}- и F_1-сублинии, сохраняют свои свойства в культуре, и ими стали широко пользоваться как моделью для изучения роли взаимодействия клеточных поверхностей в органоспецифичности метастазирования. В настоящее время имеется несколько дополнительных систем этого типа (Brunson, Nicolson, 1978; Nicolson et al., 1978; Talmadge et al., 1979).

Проведено сравнительное изучение сиалосодержащих гликопептидов клеточной поверхности, солидных меланом, полученных при перевивке клеток F_1 и F_{10} меланомы B16 и нормальных тканей мышей (Warren et al., 1975). По сравнению с нормальными тканями опухолевые клетки были богаче сиалированными фукозосодержащими гликопептидами. Хроматограммы гликопептидов, полученные при гель-фильтрации материала, взятого из меланом, растущих in vivo, более сложные, чем полученные из материала, взятого из меланом, растущих в культуре in vitro, но клеточные сублинии F_{10} и F_1 имели идентичный гликопептидный профиль, несмотря на их различную способность к метастазированию.

Различия доступности остатков сиаловых кислот поверхности клеток F_{10} и F_1 описаны Yogeeswaran и соавт. (1978). Когда F_{10}- и F_1-клетки были помечены введенным радиоактивным глюкозамином и через 48 ч обработаны нейраминидазой, полученная из интактных клеток F_{10} радиоактивность была на 80 % больше, чем из клеток F_1. В этих экспериментах превращение глюкозамина в сиаловые кислоты было одинаковым в обеих клеточных линиях. Полученные результаты согласуются с результатами ранее проведенных исследований сублиний меланомы B16 в лаборатории Bosmann (Bosmann et al., 1973).

Различия содержания сиаловых кислот в клетках F_{10} и F_1 в большей степени обусловлены сиаловыми остатками ганглиозидов, чем гликопротеидов, что было показано путем включения радиоактивности в клеточные гликолипиды и гликопротеиды с помощью галактозоксидазы и меченого боргидрида после обработки нейраминидазой — непрямого галактозоксидазного метода (Gahmberg, Hakomori, 1973; Steck, 1974; Juliano, Behar-Bannelier, 1975). Кроме того, количественные различия содержания четырех сиалогалактопротеидов, полученных из меченных непрямым галактозоксидазным методом клеток F_1 и F_{10}, были обнаружены при анализе результатов электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле. Несколько этих методик было использовано при изучении взаимоотношения сиалирования поверхности клеток и частотой метастазов в легкие опухолей, полученных с помощью трансформации вирусом клеток линии 3T3 BALB/c (Yogesswaran et al., 1979). Первичные опухоли росли до одинаковых

размеров у сингенных мышей, а процент метастазов в легкие измерялся после удаления первичной опухоли. Процент сиалирования поверхности, установленный непрямым галактозоксидазным методом, имеет значительную положительную корреляцию с частотой метастазирования в легкие in vivo. От 44 до 89 % экспонированных на всей поверхности клеток остатков галактозы и (или) N-ацетилгалактозамина были сиалированы в высоко или обычно метастазирующих линиях клеток и только 11—30 % были сиалированы в мало или неметастазирующих линиях. Показано увеличение количества и разнообразия сиалогалактопротеидов в ДСН-полиакриламидном геле для линий, обладающих высокой способностью к метастазированию. Процент глюкозаминмеченой нейраминидазозависимой радиоактивности был также использован как независимый показатель относительных различий при экспонировании групп сиаловых кислот. Результаты этих анализов были не так определенны, как те, которые были получены с помощью непрямого галактозоксидазного метода введения метки.

Возможно, что расхождения результатов отражают различия превращения глюкозамина в сиаловые кислоты, наблюдаемые у разных клеточных линий.

Непрямой галактозоксидазный метод включения метки в поверхность является высокочувствительным методом для определения изменений сиалирования, которые не выявляются другими методами анализа, например окраской перйодатшиффовым реактивом или определением количества сиаловых кислот в клеточной мембране. В общем допускается, что увеличение меченых галактозил- или N-ацетилгалактозаминил-остатков после обработки клеток нейраминидазой отражает наличие незамаскированных сахаров, так как при этом удаляются терминальные остатки сиаловых кислот. В некоторых случаях сиаловые кислоты, освобожденные нейраминидазой, могут оставаться на отдельных углеводных цепях, которые полностью блокируют ферментативные включения метки в терминальные галактозил- или N-ацетилгалактозаминил-остатки на других олигосахаридных цепях. Возможность ошибок нарастает, когда метод непрямого включения метки используется для идентификации сиалогалактопротеидов на полиакриламидном геле. Структура сиалогликопротеидов может быть изменена отрывом сиаловых кислот, который происходит в их аномальной миграции при электрофорезе на ДСН-полиакриламидном геле (Gahmberg, Andersson, 1977). Альтернативный метод существует для избирательного включения метки в остатки сиаловых кислот и заключается в окислении метаперйодатом натрия сиаловых кислот в области между C-7 и C-8 или C-8 и C-9 и последующим восстановлением полученных альдегидов NaB^3H_4 — меченным тритием боргидридом натрия (Gahmberg, Andersson, 1977). Этот метод может быть использован для независимого подтверждения результатов, полученных с помощью непрямого галактозоксидазного метода включения метки.

Включение радиоактивной метки в гликопротеиды и гликолипиды поверхности стало популярным инструментом для анализа компо-

нентов клеточной поверхности и широко используется для исследования изменений, происходящих в мембранах трансформированных клеток. Большинство исследований допускает, что ферментативное включение радиоактивной метки ограничивается только молекулами клеточной поверхности, так как ферменты настолько велики, что не пересекают барьер мембраны. Потенциально серьезной проблемой может стать то обстоятельство, что поврежденные или погибшие клетки, присутствующие при включении метки в клетку, загрязняют поверхность клеток внутриклеточными гликопротеидами и гликолипидами, которые также могут метиться. При включении меток в компоненты поверхности нельзя различить мембраносвязанные и адсорбированные сывороточные белки. Различия связывания сывороточных компонентов в поверхностно трансформированных и в нетрансформированных клетках могут приводить к артефактам в наборах меченых гликопептидов (Pearlstein, 1977). Отличный обзор, посвященный артефактам, связанным с несколькими распространенными методами включения метки в клеточную поверхность, написан Juliano, Behar-Bannelier (1975).

Качественные различия наборов меченных ^{125}I поверхностных белков, полученных в гелях, были обнаружены в клетках 3Т3 BALB/C и в их метастазирующих вариантах (Walborg, 1978). Подобному анализу были подвергнуты лимфосаркома хомячка, метастазирующая в печень, легочная карцинома Люиса (Lewis), дающая метастазы в легкие. Наборы радиойодированных гликопротеидов поверхности, полученные при электрофорезе в геле из первичных и вторичных опухолей, были качественно подобны и не отражали специфичные для опухолей устойчивые наборы гликопротеидов в органах (Cuy et al., 1979).

Сравнивали неметастазирующие и метастазирующие аденокарциномы молочной железы крыс друг с другом и с нормальной молочной железой с целью выявления различий содержания сиаловых кислот в мембранах и наборах сиалогликопротеидов в ДСН-полиакриламидном геле (Carraway et al., 1978). Содержание сиаловых кислот и структура сиалопротеидов в обеих опухолях были подобны. Три больших класса PAS-окрашиваемых гликопротеидов были обнаружены в мембранах нормальной молочной железы. Мембраны опухолей содержат уменьшенное количество гликопротеидов, в частности, с предполагаемой молекулярной массой 110 кД и со сверхнизкой молекулярной массой приблизительно 70 кД (Shin et al., 1975). Из солидной метастазирующей опухоли были получены две асцитные сублинии. Несмотря на значительные различия свойств клеточной поверхности и содержания основных сиалогликопротеидов, эти опухоли имели одинаковую скорость роста, скорость гибели и способность к метастазированию in vivo (Carraway et al., 1978).

В настоящее время роль сиаловых кислот поверхности клеток в метастазировании опухолей не ясна (Weiss, 1967). В нескольких работах было найдено, что характер распределения метастазирования клеток по органам можно модифицировать обработкой нейраминидазой (Sinha, Goldnberg, 1974; Weiss et al., 1974). Другие свойст-

ва малигнизированных клеток, включая иммуногенность, могут быть изменены с помощью специфических сиалогликопротеидов (Godington, 1978) или общего содержания сиаловых кислот на клеточной поверхности (Weiss, 1967). В нормальных клетках также удаление или химическая модификация остатков сиаловых кислот поверхности взаимосвязаны с тканеспецифической адгезией (Cafferata et al, 1979) и способностью к «самосборке» (Woodruff, Gesner, 1969).

С помощью некоторых методов стало возможным исследование взаимосвязи изменений сиалоконъюгатов на клеточной поверхности и их метастазирования. Такая возможность появилась благодаря отбору вариантов опухолевых клеток с дефектами гликозилирования (Gottlieb et al., 1975; Meager et al., 1975; Stanley et al., 1975; 1975a; 1977), измененной иммунореактивностью (Fidler et al., 1976; Talmadge et al., 1979), и адгезией (Nicolson Winkelhake, 1975; Edwards et al., 1976; Pouyssegur et al., 1976; Juliano, 1978). Способность к метастазированию может быть изменена также фармакологически, как это было недавно показано в экспериментах с меланомой В—16 (Stringfellow, Fitzpatrick, 1979). В будущем, возможно, идентифицируют и охарактеризуют гликолизированную молекулу, которая функционально включается в один или более аспектов метастазирования опухолей.

3.2.2. Специфические сиаломуцины опухолей

3.2.2.1. Гликопротеид Студдарта-Прайса

Stoddart и Price сообщили об изменениях гликозилирования в кислых гликопротеидах мембран. Изменения были связаны с появлением аномальных белков в плазматических мембранах клеток в предопухолевой ткани и опухолях (Price, Stoddart, 1976; Stoddart, 1979). Растворимые в тритоне гликопротеиды плазматических мембран нормальных эмбриональных тканей крысы и человека, а также печени, легких, селезенки, почек половозрелых крыс исследовали с помощью изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле и сравнивали с таковыми спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами гепатом крыс и их метастазов, карцином молочных желез, эпителиом, фибросарком, аденокарцином кишечника, бронхокарцином человека, лимфосарком свиней, лейкемий мышей и предопухолевых тканей, индуцированных канцерогенами. Кислые гликопротеиды с pI, приблизительно равным 4, были найдены в пределах 1—6 % общего белка, окрашенного кумасси голубым, плазматических мембран клеток опухолей и предопухолевых тканей, но они отсутствовали в плазматических мембранах клеток немалигнизированных тканей. Во внутренних мембранах клеток нормальных тканей было обнаружено содержание меньшего количества более кислых белков с pI приблизительно 3,8. Два вида гликопротеидов одновременно перемещались в ДСН-полиакриламидном градиентном геле и после обработки нейраминидазой превращались в один вид с pI

5,3. Анализируя пептидные карты полипептидной части каждого белка, установили, что они идентичны. Гликопротеид сильно гидрофобен и не растворим в водных растворах без детергентов. Гликопептидная связь чувствительна к щелочному боргидриду, что указывает на ее возможное отношение к связям «муцинового типа», которые присоединяют олигосахаридные цепи сериновыми или треониновыми остатками полипептидной цепи (Cook, 1976).

В настоящее время сиаломуцин поверхности опухолевых клеток представляет определенный интерес, во-первых, потому что он может быть выделен в чистом виде в относительно большом количестве для структурного анализа (Codington et al., 1975a; Carraway et al., 1979; Carraway, Sherblom, 1979), во-вторых, потому что его появление в опухолях коррелирует с изменением свойств клеточной поверхности (Carraway et al., 1978; 1979; Codington et al., 1978; Huggins et al., 1979) и способностью опухолей к перевивкам (Godington et al., 1978; Huggins et al., 1979).

Было бы интересным изучить, подобен ли структурно и функционально гликопротеид, описанный Stoddart и Price, другим «опухолеспецифическим» сиаломуцинам. К тому же, исследования биосинтеза белков, имеющих pI 4 и 3,8, могли бы дать информацию, играет ли роль гликозилирование белков в процессах, с помощью которых гликопротеиды локализуются в специфических клеточных мембранах.

3.2.2.2. Эпигликанин

Эпигликанин — стержнеобразной формы сиалогликопротеид с высокой молекулярной массой, который находится на поверхности мембран аллотрансплантируемой мышиной TA3 аденокарциномы молочной железы, а также в сыворотке и асцитной жидкости мышей-опухоленосителей (Cooper et al., 1974). Интерес к этигликанину возник в связи с его предполагаемой ролью в маскировке антигена гистосовместимости (Sanford et al., 1973; Codington et al., 1975). Gasic, Gasic (1962) впервые показали, что TA3-Ha — спонтанная опухоль молочной железы — содержит на поверхности клеток высокую концентрацию сиалогликопротеидов. Впоследствии в лаборатории Codington обнаружено, что при протеолизе жизнеспособных клеток появляется фракция гликопротеида с высокой молекулярной массой, содержащая много N-ацетилгалактозамина, галактозу, сиаловую кислоту, серин и треонин. Они назвали эту фракцию эпигликанин (Codington et al., 1975a). Обнаружено, что эпигликанин может ингибировать агглютинацию эритроцитов, индуцированную лектинами семян V. graminea (Springer et al., 1972), которые высокоспецифичны к B-Gal—GalNac—O-Ser (Thr)-последовательностям, присутствующим в детерминантах N-типа крови человеческих эритроцитов (Unlenbruck и Dahr, 1971). Тот факт, что эпигликанин специфически связывается лектином, дает возможность увеличить чувствительность метода его определения, основанного на адсорбции лектинов (Cooper et al., 1974), позволяя в асцитной жидкости и сыворотке мышей-опухоленосителей обнаружить такое незначительное количество

лектиносвязывающих сайтов, как 500 клеток ТА3-На и нанограммы эпигликанина. Фрагменты эпигликанина, приготовленные с помощью протеолиза поверхности опухолевых клеток и гель-фильтрационной хроматографии, содержат смесь гликопротеидов с молекулярной массой 80—460 кД и гетерогенным углеводным составом. Разнородность результатов возникает вследствие различий соотношения пропорций пяти различных типов О-гликозидных связей олигосахаридных цепей, составляющих основную часть углеводной части эпигликанина (Codington et al., 1975a). Эпигликанин, сбрасываемый с поверхности опухолевых клеток в асцитную жидкость мышей, был очищен и с помощью электронной микроскопии было обнаружено, что он состоит из молекул длиной 450—500 нм и молекулярной массой выше 500 кД. Приблизительно 75—80 % молекул углеводов находятся в 500—600 олигосахаридных цепях, соединенных О-гликозидной связью с сериновыми и треониновыми остатками полипептидного скелета, содержащего 1300 аминокислот. Наличие небольшого количества маннозы позволяет предполагать, что несколько цепей могут находиться в N-гликозидной связи с аспарагиновыми остатками (Slayter, Codington, 1973; Codington et al., 1975a; 1978).

Эпигликанин содержит приблизительно 60 % сиаловых кислот клеточной поверхности (Codington, 1978), большинство из которых доступны для нейраминидазы (Miller et al., 1977). В работе (Codington et al., 1975) установлено, что 10^9 клеток ТА3-На содержит 2,3 мг этого гликопротеида, а в одной клетке имеется около 5 млн. молекул. Эпигликанин не определяется на поверхности мембран клеток нормальной ткани мышей (Codington et al., 1975). Биологические функции эпигликанина исследовались путем сравнения характеристик роста клеток штамм-неспецифических асцитных сублиний (ТА3-На, ТА3-ММ) с гибридными клонируемыми линиями, полученными в результате слияния ТА3-На с нормальными эмбриональными фибробластами сингенных мышей (линия А) (Codington et al., 1978; 1979; Cooper et al., 1979) или клетками сублинии ТА3-St. Обе линии, ТА3-На и ТА3-St, были штамм-специфическими и перевивались только сингенным мышам. Однако после продолжительного пассирования путем внутрибрюшинных перевивок клетки ТА3-На теряли штамм-специфичность и могли перевиваться на чужеродных мышей. Линия клеток ТА3-ММ возникла в связи с небрежностью, допущенной в течение ранних пассажей ТА3-St в организм мышей. В результате клетки были инфицированы Pasteurella pneumotropica и Pasteurella multocida. Как показано в табл. 1, эти сублинии различаются по некоторым биологическим свойствам. С помощью таких линий доказана предполагаемая ранее функциональная роль эпигликанина в аллогенной перевиваемости ТА3-На. В культуре клеток ТА3-На как эпигликанин, так и способность к аллотрансплантации исчезали одновременно после нескольких недель роста и снова появлялись при пассировании клеток как асцитных опухолей мышей (Miller et al., 1975). Аллотрансплантируемые сублинии, производные ТА3-St, содержат поверхностный сиалогликопротеид, который подобен, если не идентичен, эпигликанину ТА3-На по молекулярной массе,

Таблица 1. **Сравнение асцитных сублиний ТА3**

Свойство	Описание	Источник
Кариотип	ТА3-На набор хромосом близок к диплоидному (42 модальные хромосомы) ТА3-St субтетраплоидный (68 модальных хромосом) ТА3-ММ около тетраплоидного (80 модальных хромосом) и утрачена метацентрическая хромосома, маркирующая ТА3-St и ТА3-На	Cooper et al., 1979 Friberg, 1972
Связывание фитогемагглютинина (ФГА) и конкапавалина А (Кон А)	ТА3-На < ТА3-ММ/2 ~ ТА3-St	Codington et al., 1979
Связывание лектина V. graminea	ТА3-На ~ ТА3-ММ/1 > > ТА3-ММ/2 ≫ ТА3-St	Codington et al., 1979
Иммуногенность	ТА3-На < ТА3-St	Friberg, Lilliehook, 1973
Иммунорезистентность	ТА3-На > ТА3-St	Friberg, Lilliehook, 1973
Экспонированность H-2ᵃ-антигенов	ТА3-На ≪ ТА3-St	Codington et al., 1978; Sanford et al., 1973; Friberg, Lilliehook, 1973
Морфология поверхности	ТА3-На имеет длинные микроворсинки и сеть из тонких нитей, которые распространяются на 200—500 нМ от плазматической мембраны и состоят главным образом из сиаловых кислот клеточной поверхности, ТА3-St утратили нити и микроворсинки	Miller et al., 1977
Скорость роста при внутрибрюшинной перевивке сингенным мышам	ТА3-На, ТА3-ММ, ТА3	Codington, 1978
Способность образовывать широкораспространенные метастазы при внутривенном введении	ТА3-На — да, ТА3-St — нет	Cooper et al., 1977

углеводному и аминокислотному составам и реактивности к лектинам (Codington et al., 1979; Cooper et al., 1979).

Относительный уровень этого гликопротеида в клетках коррелирует со способностью к аллотрансплантации 6 гибридных клеточных линий (ТА3-На + нормальные мышиные эмбриональные фибробласты). Пассирование клеток ТА3-St в организм больных пневмонией сингенных мышей в течение первой недели приводит к исчезновению с поверхности клеток эпигликанина и появлению клеток ТА3 ММ,

имеющих рецепторы и способных расти в организме чужеродных мышей (Cooper et al., 1979). Длительное культивирование in vitro этих клеток приводило к восстановлению штамм-специфичности и потере лектинсвязывающих сайтов (Codington et al., 1979). Еще не ясно, происходит ли при восстановлении штамм-специфичности ТА3-St полное исчезновение эпигликанина или его потеря является результатом структурных изменений, при которых изменяются лектинсвязывающие сайты лектина.

На основании изучения адсорбции антител к H-2[a] клетками ТА3-На, ТА3-St и гибридными клеточными линиями (Friberg, Lilliehook, 1973; Sanford et al., 1973; Codington et al., 1978), по-видимому, можно считать, что способность к аллотрансплантации возникает вследствие маскировки H-2[a] антигена эпигликанином, хотя эпигликанин, сброшенный с поверхности клеток, может также подавлять или блокировать иммунный ответ хозяина на опухоль (Cooper et al., 1974). Остается уточнить, происходит ли маскировка антигена эндогенными, подобными эпигликанину гликопротеидами, появляющимися в иных, чем ТА3, опухолях.

Эпигликанин может играть важную роль в процессе метастазирования опухолевых клеток. Метастазирующие линии клеток ТА3-На, выделенные по их способности прививаться во многих органах после внутривенного введения сингенным мышам, синтезируют и содержат в 3 раза больше гликопротеидов, связывающих лектины V. graminea (предполагается, что это эпигликанины) в культуральной среде in vitro при включении в них метки с помощью меченного тритием глюкозамина, чем неметастазирующие линии.

3.2.2.3. ASGP-1

Основной сиалогликопротеин, обнаруженный на поверхности клеток асцитной крысиной аденокарциномы молочной железы 13 762, является молекулой «муцинового типа» с молекулярной массой приблизительно 600 кД, названный Carraway и сотрудниками ASGP-1 (Carraway и Sherblom, 1979; Howard et al., 1979; Huggins et al., 1979). Из основной опухоли были получены две асцитные сублинии MAT-C1 и MAT-B1, которые значительно различаются морфологией поверхности, способностью к агглютинации с помощью лектинов, перевиваемостью и содержанием доступных к нейраминидазе сиаловых кислот (табл. 2). ASGP-1 избирательно связывается с лектином PNA, который является специфичным для последовательностей β-D-Gal-(1 → 3)-D-GalNac-Ser T-групповой детерминанты крови (Howard et al., 1979). ASGP-1 молекулы отличаются друг от друга в клетках линий MAT-B1 и C1 по их углеводному составу (C1, 70 %; B1, 65 %), сиаловым кислотам (C1 содержит в 3 раза больше сиаловых кислот, чем B1) и степени сульфатации (B1 значительно сульфатирована, в то время как C1 нет). Хотя ASGP-1 в некотором отношении подобен эпигликанину, этот белок не обнаружен в солидных аденокарциномах молочной железы, его наличие не коррелирует

Таблица 2. **Сравнение асцитных опухолей MAT-C1 и MAT-B1**

Свойство	MAT-C1	MAT-B1
Наличие микроворсинок	Плотные высокоразветвленные	Умеренной плотности, неразветвленные
Агглютинация при помощи конканавалина А (Кон А)	Нет	Да
Мобильность рецепторов Кон А (т. е. образование шапок и пэтчей)	Неподвижны	Подвижны
Перевиваемость на		
крыс	Да	Да
мышей	Да	Нет
Относительное содержание доступных к нейраминидазе сиаловых кислот на поверхности клеток	5×	1×

со способностью к метастазированию или скоростью роста двух сублиний и, как было установлено, его состав отличается от такого эпигликанина.

3.2.3. Фибронектины

Фибронектины — семейство иммунологически перекрестнореагирующих гликопептидов, которые обнаружены в растворимой форме как в плазматической мембране, так и в кондиционированной культуральной среде и как нерастворимые компоненты базальных мембран, внеклеточного матрикса и наружной поверхности клеток (подробнее — в обзорах Lindler et al., 1978; Mosesson, 1978; Ruoslahti, Engvaal, 1978; Yamada Olden, 1978). Представители семейства фибронектинов обладают различной молекулярной массой. Преобладают формы размерами приблизительно 450, 235, 220, 200 кД, но также описаны продукты значительной деградации фибронектинов с молекулярной массой 250 кД (Chen et al., 1967; Rieber et al., 1975; Ruoslahti, Vaheri, 1975; Mosher, 1977; Jaffe, Mosher, 1978; Keski-Oja et al., 1976; Linder et al., 1975; Rieber, Rieber, 1979). Фибронектин плазмы человека (PFN) идентичен иммунологически и по аминокислотному составу не растворимому в условиях холода глобулину (Ruoslahti, Vaheri et al., 1973; 1974; Ruoslahti, Engvaal, 1978). Нативный PFN имеет молекулярную массу 450 кД, и молекула его состоит из двух субъединиц (по 220 кД каждая, которые имеют в определенной степени β-структуру (Morrison et al., 1948; Mosesson et al., 1975; Mosesson, 1978; Mosher, 1975).

PFN очень чувствителен к протеазам, таким, как плазмин и трипсин. Основные формы, возникающие при протеолитической деградации,— 235, 220 кД соответственно. Выяснилось, что форма 235 кД состоит из субъединицы 220 кД, которая присоединена к небольшому фрагменту второй субъединицы 220 кД. Продукт, масса которого составляет 200 кД, обладает высокой устойчивостью к дальнейшему

протеолизу, в результате чего ограничивается протеолиз 220 кД-субъединицы (Keski-Oja et al., 1976).

Клеточные фибронектины (CFN) являются идентичными к PFN как по аминокислотному составу, так и по иммунологическим свойствам (Ruoslahti et al., 1973; Ruoslahti, Vaheri, 1974, 1975; Ruoslahti, Engvaal, 1978). CFN — большой класс белков поверхности многих клеток, который в некоторых системах составляет до 3 % общего клеточного белка (Hynes, 1973; Keski-Oja et al., 1976; Yamada u Olden, 1978). Клеточный фибронектин продуцируется различными клетками, среди которых имеются фибробласты (Hynes, 1973; Kuusela et al., 1975; Ruoslahti et al., 1973; Vaheri, Ruoslahti, 1975), клетки глии (Vaheri et al., 1976), глакомышечные клетки (Bornstein et al., 1978), эпителиальные (Bornstein et al., 1978; Jaffe, Mosher, 1978) и различные примитивные эмбриональные мезенхимальные клетки (Linder et al., 1975; Mosher, Vaheri, 1978).

Преобладающая форма CFN с молекулярной массой 220 кД продуцируется фибробластами, однако эпителиальные клетки синтезируют белок с молекулярной массой 200 кД (Linder et al., 1975; Ruoslahti, Vaheri, 1975; Mosher, 1977; Jaffe u Mosher, 1978). Описаны две формы внеклеточного фибронектина. Первая — растворимая форма, которая находится в окружающей среде, тогда как вторая — нерастворимая форма — включена в базальные мембраны и внеклеточный матрикс особенно соединительной ткани (Yamada, Weston, 1974; Linder et al., 1975, 1978; Tesoriere et al., 1975; Stenman и Vaheri, 1978; Mosher, 1977). Растворимые и нерастворимые формы имеют одинаковый аминокислотный состав, но существенно различаются углеводными боковыми цепями (Carter et al., 1978). Предполагается, что внеклеточный фибронектин образуется в результате сбрасывания связанных с клеточной поверхностью молекул фибронектина (Carter et al., 1978).

Как плазматический, так и клеточный фибронектины имеют высокое сродство к связыванию с фибрином и фибриногеном (Edsall et al., 1955; Ruoslahti, Vaheri, 1975), коллагеном (Klebe, 1974; Pearlstein et al., 1976; Bornstein, Ash, 1977; Engvall, Ruoslahti, 1977) и ДНК (Parsons et al., 1979), а форма нерастворимого в условиях холода комплекса фибронектина — с гепарином (Mosesson, 1978).

В настоящее время физиологическая роль фибронектинов основывается главным образом на предположениях. Их сродство к связыванию с фибрином и фибриногеном, высокий уровень в тромбах крови привели некоторых исследователей к предположению, что один (или более) фибронектин участвует в образовании или стабилизации тромбов крови (Ruoslahti, Vaheri, 1975; Mosher, 1978; Ruoslahti, Engvaal, 1978). Сродство к связыванию с коллагеном предполагает внесение фибронектином вклада в процесс заживления раны и восстановления ткани с помощью перекрестного связывания с коллагеновым матриксом (Mosher, 1978). Способность фибронектина облегчать превращение плазминогена в плазмин указывает на возможность того, что фибронектин может также играть противоположную роль, усиливая лизис тромба (Iwanaga et al., 1978).

Частое обнаружение фибронектина на поверхности клеток в местах адгезии и межклеточных контактов, способность этих белков как агглютинировать клетки, так и облегчать их адгезию , твердому субстрату привели к широко распространенному мнению о том, что фибронектин может функционировать как адгезивный фактор поверхности (Culp, 1976; Pearlstein et al., 1976; Pouyssegur, Pastan, 1976; Ali et al., 1977; Yamada et al., 1976; Ruoslahti, Engvaal, 1978). Резкие изменения уровня фибронектина наблюдаются в течении различных процессов развития и дифференцировки, что позволяет полагать о возможной роли фибронектина в морфогенезе, хотя их точную функцию еще нужно установить (Furcht et al., 1978; Wartiovaara et al., 1978; Yamada, Olden, 1978). Как и в других подобных случаях, доказательством причастности фибронектина к процессам опухолеобразования явилось открытие взаимосвязи уровня фибронектина и трансформации клеточных культур, инфицированных потенциально онкогенным вирусом.

В 1973 г. Hynes (Hynes, 1973) показал, что культуры клеток хомячка NIL1 и NIL8 содержат высокий уровень клеточного фибронектина, тогда как семьи производных культур, инфицированных вирусами RSV, и полиомы содержат мало или не содержат совсем CFN. Хотя проверка клеток на опухолеобразование in vivo не проводилась, известный онкогенный потенциал этих вирусов свидетельствует в пользу предположения, что потеря или снижение уровня клеточного фибронектина связаны с онкогенной трансформацией. Фундаментальные исследования Hynes, согласно которым инфицирование клеток потенциально онкогенными вирусами приводит к уменьшению содержания CFN, были быстро подтверждены и расширены во многих лабораториях (Gahmberg et al., 1974; Hogg, 1974; Pearlstein, Waterfield, 1974; Stone et al., 1974; Vaheri, Ruoslahti, 1974). Однако в этих исследованиях не проводилось изучения способности инфицированных клеток к опухолеобразованию in vivo. В связи с этим невозможно определить, является ли снижение CFN причинносвязанным с онкогенной трансформацией непосредственно или только через вирусную инфекцию.

Последующие эксперименты, в которых исследовалась способность клеток к опухолеобразованию, привели к противоречивым результатам. Связанная с трансформацией потеря CFN была обнаружена сотрудниками нескольких лабораторий. В исследованиях линий эмбриональных клеток крыс до и после инфицирования аденовирусами Chen и соавт. (1967) и Galimore и соавт. (1977) обнаружили, что фибронектин присутствовал во всех клетках контрольных культур и двух инфицированных, перевивка которых животным не приводила к образованию опухолей. В противоположность этому только в одной из восьми инфицированных, способных к образованию опухолей клеточных линий, присутствовал фибронектин во всех клетках. В пяти линиях, способных к образованию опухолей in vivo, 10 % (и менее) клеток содержали фибронектин. В двух оставшихся опухолегенных линиях 30—60 % клеток содержали фибронектин. Так, в REC-аденовирусной системе онкогенная трансформация не обяза-

тельно связана со значительным снижением относительного содержания клеток, в состав которых входит фибронектин.

Уменьшение уровня фибронектина также обнаружено в клетках почки новорожденных хомяков (NHK), инфицированных вирусом простого герпеса (HSV) (Chen et al., 1978). Нормальные первичные культуры и не образующие опухолей линии клеток, инфицированных вирусом (HSV), имели высокий уровень фибронектина, количество которого определялось с помощью радиоиммунологического анализа.

В противоположность этому в клетках семи опухолеобразующих линий клеток, инфицированных HSV, уровень содержания фибронектина находился в пределах 6—50 % контрольного уровня (Chen et al., 1978). Так, во всех случаях онкогенная трансформация вирусом HSV клеток NHK приводила к значительному снижению уровня фибронектина в культуре.

Сходные результаты получены при исследовании линии клеток ВНК 21-С13. Четыре опухолеобразующие линии этих клеток, инфицированных вирусом Ad5, имели в культуре более низкий уровень фибронектина по сравнению с линией, из которой они были получены, и не образующей опухолей при перевивке сирийским хомякам (Meager et al., 1978). Однако эти результаты надо интерпретировать осторожно, так как во многих лабораториях было показано, что клетки линии ВНК могут вызывать опухоли (гл. 2). Результаты, полученные Meager и соавт. (1978), позволяют предположить, что полученные данные об уменьшении содержания фибронектина в клетках ВНК в сущности скорее отражают действие вируса на линию опухолевых клеток, чем процесс онкогенной трансформации.

Отсутствие корреляции между уменьшением содержания фибронектина и превращением нормальных клеток в опухолевые было показано в некоторых лабораториях. В серии исследований семи линий клеток эмбрионов крыс, их производных сублиний, инфицированных вирусом SV40, Kahn и Shin (1979) не обнаружили корреляции между уровнем фибронектина в этих клетках и образованием опухолей при перевивке их безволосым мышам. В этих же работах отсутствие такой корреляции было продемонстрировано в экспериментах с клетками ВНК и их производными, полученными инфицированием вирусом полиомы, а также с клетками линии 3Т3 при их трансформации вирусом SV40. Обнаружена утрата корреляции между уровнем фибронектина и образованием опухолей в клеточных линиях, трансформированных как спонтанно, так и химическими веществами, а также в первичных культурах нормальных и опухолевых тканей. Три из четырех линий клеток мышей C3H/10T$\frac{1}{2}$/CL8, трансформированных химическими канцерогенами, имели уровень фибронектина выше, чем в нормальных (Jones et al., 1976). Полное отсутствие корреляции между уровнем фибронектина и образованием опухолей также продемонстрировано на 12 линиях клеток человека (Der, Stanbridge, 1978) и на более чем 40 линиях клеток разных видов животных, трансформированных различными агентами (Kahn, Shin,

1979). Несмотря на то что нормальные фибробласты имеют тенденцию накапливать высокий уровень фибронектина, нормальные эпителиальные клетки либо имеют тенденцию к полной утрате фибронектина, либо содержат только небольшое количество этого белка (Chen et al., 1977; Asch, 1979; Kahn, Shin, 1979). Это позволяет предположить, что изменения содержания клеточного фибронектина, возможно, скорее отражают процессы дифференцировки, чем трансформации. При исследовании около 20 линий клеток мышей, крыс, хомяков и человека, полученных непосредственно из злокачественных опухолей, Pearlstein и сотрудники обнаружили, что все исследованные карциномы были полностью лишены фибронектина, в то время как в саркомах уровень фибронектина существенно варьировал от 0 до очень высоких значений. Многие саркомы имели больше фибронектина, чем некоторые первичные культуры, приготовленные из нормальных тканей (Pearlstein, 1976). Подобным образом не найдена взаимосвязь фибронектина и тканевого происхождения серий первичных культур, приготовленных из аденокарциномы молочной железы мышей и эпителиальных клеток нормальной молочной железы (Asch, 1979). Значительное увеличение в процентном отношении содержащих фибронектин клеток обнаружено после гибридизации родительских линий, которые были уже опухолевыми, что еще раз указывает на утрату взаимосвязи способности к образованию опухолей и наличия фибронектина (Marciani et al., 1976).

Главным источником артефактов в исследованиях фибронектина явилось открытие зависимости его содержания от плотности клеток. Как количество, так и локализация клеточного фибронектина обычно изменяются по мере увеличения популяционной плотности в культуре. Почти во всех линиях клеток, синтезирующих CFN, его количество прогрессивно увеличивается по мере увеличения плотности клеток и длительности их культивирования (Gahmberg et al., 1974; Pearlstein, Waterfield, 1974; Mautner, Hynes, 1977; Der, Stanbridge, 1978; Furcht, 1978; Kahn, Shin, 1979). Эта зависимость содержания CFN от плотности культуры может несколькими путями приводить к артефактам. Незначительные различия скорости роста в двух культурах могут привести в течение 10 ч культивирования к значительным различиям популяционной плотности и, следовательно, содержания фибронектина в культуре. Аналогично этому незначительные различия эффективности разделения клеток в процессе субкультивирования двух разных клеточных линий могут приводить к возникновению многоклеточных агрегатов (пересаживаемых в качестве дочерних культур), отличающихся числом клеток. Клетки этих агрегатов в экспериментах будут иметь ненормально высокую плотность популяции, которая может натолкнуть на ложное представление о различии продукции фибронектина этих двух клеточных линий. Наконец, клеточные линии значительно различаются способностью образовывать стабильные клеточные контакты в субконфлюентных плотностях (Skehan, Friedman, 1979). В линиях, которые имеют тенденцию к образованию кластеров, становится невозможным разделение клеток по местам их контактов. В этих линиях образуются сравнительно

большие многоклеточные группировки с большим количеством клеточных контактов. Они имеют высокую локальную плотность популяции. Клетки с такой же самой плотностью популяции, но не образующие кластеров в субконфлюентной фазе, будут иметь меньше контактов и обладать меньшей локальной плотностью популяции. Так, при однаковой общей плотности двух линий клеток количество фибронектина, которое они продуцируют, может существенно отличаться, потому что отличается их локальная плотность популяций. Эти артефакты не учитывались экспериментаторами при анализе результатов сравнительных исследований продукции фибронектина.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что инфицирование культур клеток потенциально онкогенными вирусами обычно, хотя не обязательно, сопровождается потерей или снижением содержания фибронектина. Уменьшение наступает независимо от того, становятся ли инфицированные клетки опухолевыми. Так, уменьшение CFN, которое сопровождает инфицирование клеток потенциально онкогенными вирусами, возможно, отражает скорее влияние вируса, чем эффект онкогенной трансформации. В спонтанно трансформирующихся и трансформированных химическими веществами линиях клеток не обнаружена корреляция способности их к образованию опухолей и количества клеточного фибронектина. Аналогичные результаты получены на первичных культурах, приготовленных из тканей in vivo, уровень фибронектина был независим от нормальной или малигнизированной ткани и ее происхождения. Проанализировав опубликованные данные, можно прийти к выводу, что совсем не существует корреляции содержания фибронектина и способности клеток к образованию опухолей.

3.2.4. Гликопротеид Бромвелл—Гаррисса

Развитие методов исследования гликопротеидов, основанных на их сродстве к лектинам (см. обзор Juliano, 1978), значительно облегчило изучение роли изменений гликолизирования белков в онкогенной трансформации клеток. Один такой метод использует меченные радиоактивным йодом лектины для обнаружения гликопротеидов после разделения ДСН—ПААГ-электрофорезом (Robinson et al., 1975; Tanner Anstee, 1975; Burridge, 1976; Gurd Evans, 1976; Gurd, 1977). Bramwell и Harris использовали этот метод в сочетании с соматической гибридизацией клеток для выявления в составе мембран гликопротеидов, которые могут быть связаны с процессом превращения нормальных клеток в опухолевые (Bramwell, Harris, 1978, 1978a).

В предыдущих исследованиях, выполненных Harris и сотрудниками, было обнаружено, что слияние клеток, имеющих высокую способность к образованию опухолей, с клетками, которые имели низкую опухолегенность или вообще не имели ее, приводило к образованию гибридов, проявляющих существенно сниженную способность к образованию опухолей после перевивки их генетически совместимым сублетально облученным новорожденным мышам или бестимусным безволосым мышам (Harris, 1971). Этот феномен был назван «супрес-

сия малигнизации». После разных периодов культивирования гибридов снова проверялась их способность к прогрессивному росту in vivo, которая могла быть детерминирована наличием общих рецессивных дефектов.

Нормальные клетки или клетки со значительно сниженным потенциалом к опухолеобразованию должны устранить эти дефекты при гибридизации с опухолевыми клетками и посредством этого подавить малигнизацию. Повторное появление признаков опухолевых клеток в популяциях гибридных клеток может возникнуть в результате продолжительного отбора генетических вариантов в связи с потерей или перестановкой родительских хромосом или экстрахромосомных генов (Harris, 1971; Jonasson, Harris, 1977). Клетки, обладающие высокой способностью к опухолеобразованию, должны избирательно подавить рост родительской популяции, чтобы вырасти в пальпируемые опухоли (Harris, 1971).

По мнению Bramwell и Harris, фенотипическими признаками, близко связанным с экспрессией злокачественного поведения клеток in vivo, являются (1) признаки, которые экспрессируются в родительских популяциях опухолевых клеток, (2) признаки, которые исчезли в гибридах, сопутствующие супрессии малигнизации, и (3) признаки, появляющиеся снова в опухолях, которые независимо росли из полученных популяций гибридов (Bramwell, Harris, 1978).

Различия связывания ^{125}I конканавалина А (Кон А) и агглютинина проростков семян пшеницы (WGA) с разделенными в электрофорезе гликопротеидами мембран нормальных, малигнизированных и клеток, у которых имеется супрессия малигнизации, были использованы Bramwell и Harris как тест для определения изменений состава гликопротеидов мембран, связанных с малигнизацией (Bramwell, Harris, 1978; 1978а). Были выявлены кислые гликопротеиды с pI приблизительно около 4, которые изменяли свою способность связываться с Кон А и WGA параллельно с изменением способностей этих клеток к опухолеобразованию. В злокачественных клетках белок связывался с Кон А в большей степени, чем с WGA, тогда как в немалигнизированных клетках и гибридах, характеризующихся супрессией малигнизации, наблюдалась обратная картина. Нет данных, позволяющих предполагать, что экспрессия гликопротеидов, изменяющихся при малигнизации, зависит от роста ткани. Различия лектиносвязывающих свойств более выражены в опухолях, растущих in vivo, чем в культивируемых in vitro опухолевых клетках. В своей нативной форме гликопротеид в плазматической мембране находится в виде димеров (молекулярная масса приблизительно 200 кД), которые после обработки восстанавливающими дисульфидные связи агентами превращались в мономеры с молекулярной массой 100 кД. Поведение белка с молекулярной массой 200 кД в некотором отношении подобно рецептору глюкозы эритроцитарных мембран (Krupka, 1971; Jung, 1974). Например, его можно пометить, ковалентно связав с динитрофлюоробензолом в реакции, которая стимулируется глюкозой и ингибируется цитохалазином В. В настоящее время не известно, относится ли этот белок к другим Кон А-связывающим глюкозорегу-

лирующим белкам, описанным для многих нормальных и трансформированных типов клеток (Shiu et al., 1977; Poussegur, Yamada, 1978; McCormick et al., 1979).

Оценивая эти эксперименты, важно определить допущения, которые лежат в основе теста генетической сегрегации и способа связывания лектинов, с помощью которого осуществлялись исследования. Генетический сегрегационный тест, используемый авторами для определения, является ли данная характеристика непосредственно связанной с малигнизацией, основан на следующих предпосылках: (1) супрессия малигнизации осуществляется на генетическом уровне, (2) она появляется во всех клетках первичной популяции гибридов и (3) она влияет на такие свойства опухолевых клеток, которые определяют их способность к прогрессивному росту in vivo и которые на этапе слияния клеток не меняют иммуногенности, жизнеспособности или перевиваемости полученных популяций гибридов.

Так как в ранних исследованиях было обнаружено, что гибриды при супрессии малигнизации содержат почти полный набор хромосом обеих родительских клеток и повторная экспрессия опухолегенности связана с селективной потерей гибридами хромосом (Harris, 1971), то полагали, что при супрессии малигнизации набор хромосом должен обязательно изменяться. Последующие исследования опровергли эти данные. Супрессия малигнизации не была связана с появлением каких-либо заметных компонентов хромосом из немалигнизированных клеток (Jonasson, Harris, 1977) и повторная экспрессия признаков малигнизированных клеток не коррелировала с потерей каких-либо нормальных родительских хромосом. Таким образом, в настоящее время механизм супрессии малигнизации не ясен.

В связи с относительно большим размером инокулума клеток (10^4 и выше), который обычно используется в тестах, определяющих способность к опухолеобразованию гибридов при супрессии малигнизации, нельзя исключить наличия в инокулуме очень малого количества клеток, сохранивших свою способность к опухолеобразованию. Действительно, в ранних исследованиях показано, что частота образования опухолей клонами гибридов значительно варьировала (Wiener et al., 1971; Klein et al., 1973) и это приписывалось нестабильности кариотипа популяций гибридов (Wiener et al., 1974). Однако другие эксперименты свидетельствуют о том, что в популяциях, имеющих супрессию малигнизации и стабильный кариотип, могут присутствовать гибриды, обладающие опухолегенностью (Jonasson et al., 1977; Sager, Kovac, 1978). Sager и Kovac проверили на опухолеобразование гибриды эмбриональных фибробластов китайского хомяка, используя введение очень малого количества клеток. Они вводили в инокулум облученных клеток, не образующих опухолей, до 10 гибридов на инъекцию и доказали возможность наличия опухолегенных клеток в популяциях гибридов с супрессией малигнизации. Эти эксперименты не позволяют утверждать, что изменение гликозилирования белков коррелирует с экспрессией признаков злокачественности in vivo, как это сделали Bramwell и Harris Если после слияния клеток небольшой процент гибридных клеток останется

способным к опухолеобразованию или приобретет эту способность в результате генетической сегрегации in vitro, корреляция малигнизации и изменения экспрессии гликопротеидов должна обнаруживаться на клеточном уровне. Однако такого рода исследований проведено не было.

Причины феномена неспособности гибридов к образованию опухолей от начала до конца не исследованы. Изучалась лишь возможность участия в этом феномене изменений антигенности гибридов, тогда как другие вероятные объяснения его не рассматривались. Например, слияние клеток само по себе может изменить межклеточные взаимодействия или места прикрепления, необходимые малигнизированным клеткам для поддержания жизнеспособности в течение ранних стадий трансплантации животным-хозяевам (гл. 2). Если это может происходить, то способность к прогрессивному росту in vivo отражает не супрессию малигнизации, а скорее снижение жизнеспособности клеток в период трансплантации.

Биохимические методы также заслуживают тщательного критического анализа. В экспериментах Bramwell Harris (1978) проведено сравнение связывания лектина с гликопротеидами мембран исходных клеточных линий, гибридов и полученных при перевивке гибридов опухолей. Гликопротеиды экстрагировались из теней мембран (Atkinson, 1973), стабилизированных $ZnCl_2$, или из суспензий нормальных и опухолевых тканей 0,5 %-ным тритоном Х-100 в трис-буфере. Маловероятно, что препараты плазматических мембран немалигнизированных и малигнизированных тканей или сходных родительских и гибридных клеточных линий сравнивали в чистом виде или что экстрагированные гликопротеиды извлечены исключительно из поверхности мембран. Тритоновые экстракты тканей были явно загрязнены цитоплазматическими белками, а тот, якобы установленный факт, что эти загрязнения не мешают последующему анализированию гликопротеидов поверхности, не подтвержден соответствующими исследованиями. Растворенные в трипсине белки разделялись с помощью электрофореза в системе ДСН — градиентный ПААГ (7,5—20 %) с буферной системой Laemmli (1970) или с помощью двухмерного изоэлектрического фокусирования ДСН — ПААГ-электрофореза по O'Farrell (1975). Обработанные гели лектинами содержали гликопротеиды (молекулярная масса приблизительно 100 кД), которые в препаратах опухолевых клеток связывали незначительное количество меченых WGA и большое количество Кон А по сравнению с нормальными клетками или клетками с супрессией малигнизации.

В этих исследованиях не были изучены возможности того, что специфическое связывание лектина может быть измерено с помощью конкурентного ингибирования связывания гаптеновым сахаром, что лектины могут быть использованы в концентрации, достаточной для насыщения сайтов, обладающих как высоким, так и низким сродством, или что WGA и Кон А могут быть связаны молекулами одного вида во всех клеточных препаратах, которые анализировались. Для сравнения связывания Кон А и WGA с белками, молекулярная масса кото-

рых составляла 100 кД, определяли площадь пика, полученного при микроденситометрическом сканировании ауторадиографов геля, и ее выражали в процентах общего связывания лектина с гелем. Представленное в работе Bramwell, Harris (1978), рис. 4 и 5, разрешение пиков недостаточно, чтобы принять результаты этих измерений без сомнений. Более того, существенные различия значений вычисленного отношения Кон A/WGA в нормальных и малигнизированных клетках тоже должны быть поставлены под сомнение, так как общее связывание лектина, надо полагать, включает как специфическое, так и неспецифическое связывание, а в некоторых случаях и связывание с гликопротеидами, не относящимися к поверхности.

Если не учитывать это при оценке полученных данных, выявляются трех- и пятикратные различия (в процентах) значений Кон A/WGA по связыванию их с белком (молекулярная масса которого 100 кД), выделенным из немалигнизированных исходных клеток или гибридов с супрессией малигнизации по сравнению с таковым, полученным из исходных или гибридов опухолевых клеток. К сожалению, не показано, как скоро после гибридизации были сделаны эти измерения или является ли экспрессия нормальных белков с молекулярной массой 100 кД также нестабильной в гибридных клонах в состоянии супрессии малигнизации при культивировании их in vitro в течение короткого времени (Jonasson et al., 1977).

Резюмируя изложенное, нужно отметить, что результаты, полученные Bramwell и Harris, хотя и вызывают интерес новизной, однако должны быть подтверждены с помощью более точных методов анализа.

3.2.5. Мембранные белки, индуцированные SV40

В противоположность ранее обсуждаемым исследованиям, в которых делались попытки связать общие изменения гликозилирования мембран опухолевых клеток с ростом опухолей и метастазированием, исследования Wallach и соавт. (Schmidt — Ullrich et al., 1975, 1977, 1978; Lin et al., 1977; Verma et al., 1977) направлены на решение вопроса, как изменения белков в плазматических мембранах опухолевых клеток модифицируют физические свойства мембран. В качестве модельных систем использовались нормальные лимфоциты хомяка и клетки лимфоидных опухолей, индуцированные SV40 (GD248).

Эти исследования заслуживают внимания не только тем, что авторы старались получить высокоочищенные, с хорошими характеристиками плазматические мембраны из нормальных и опухолевых клеток, но также разнообразием используемых методических приемов.

Некоторые изменения в мембранах опухолевых клеток определялись с помощью изоэлектрического фокусирования тритоновых экстрактов мембран GD248 и нормальных лимфоцитов (Schmidt — Ullrich et al., 1975, 1978). Во-первых, обнаружено, что белки мембран опухолевых клеток фокусируются в более широкой области значений pH, чем белки нормальных мембран, PAS-окрашенные гликозилированные белки фокусируются при более кислых значениях pH,

тогда как негликолизированные белки перемещаются в область более щелочных значений pH (7,5—8). Во-вторых, установлено, что в мембранах опухолевых клеток появлялась новая группа гликопротеидов, значение pI которых составляло 4,5. Увеличение кислотности гликопротеидов было отнесено за счет повышенного содержания сиаловых кислот, хотя доказательств в пользу этого в работе не представлено.

Щелочное смещение было исследовано с помощью метода лазерной раман-спектроскопии, который регистрирует изменения молекулярного движения липидов и белков мембран, их межмолекулярные взаимодействия с гидрофобной сердцевиной мембран и особенности структурных конформационных изменений полипептидов в мембранах. При сравнении спектров мембран нормальных и опухолевых клеток в областях Амид 1 и Амид 2 с такими стандартами амидов, как аспарагин, глютамин и поли-L-аспарагин, щелочной сдвиг был связан с увеличением амидных остатков боковых цепей аспарагиновой и глютаминовой кислот, что является характерной чертой стимулированных Кон А, а не покоящихся лимфоцитов (Wallach et al., 1979). Аспарагиназа — фермент, который используется в клинике при лечении аспарагинсинтетаздефицитных лимфоидных новообразований, предотвращает стимуляцию митогенеза в покоящихся лимфоцитах конканавалином А с помощью неизвестного механизма, приводящего к модификациям плазматической мембраны. Wallach и сотрудники предположили, что недостаточное посттрансляционное деамидирование мембранных белков может быть необходимым для пролиферации лимфоцитов.

Двухмерное изоэлектрическое фокусирование в комбинации с иммуноэлектрофорезом позволило обнаружить два новых гликопротеидных антигена с pI 4,5 и 4,7 в мембранах опухолевых клеток (Schmidt-Ullrich et al., 1977), SV40-специфические белки имели предполагаемую молекулярную массу 50—60 кД и 90—100 кД соответственно и, по мнению авторов, представляли TSTA- и U-антигены (Schmidt-Ullrich et al., 1978). Гликопротеид, имеющий pI 4,5, обнаружен только в трансформированных SV40 клетках, где его содержание превышало 10 % всех окрашиваемых куммасси голубым белков. Наличие большого количества необычных гликопротеидов в плазматических мембранах опухолевых клеток подтвердило предположение, что физические свойства их мембран могут быть изменены. Это было впоследствии подтверждено результатами исследования мембран нормальных лимфоцитов и клеток GD248 с помощью лазерной раман-спектроскопии (Schmidt-Ullrich et al., 1975, 1978; Verma et al., 1977; Wallach et al., 1979). Были обнаружены значительные различия температуры индуцирования фазовых переходов липидов и белков мембран. При анализировании CH-растянутой и акустической областей спектра установлено, что в мембранах GD248 T_1 появился при температуре на 12 °С ниже, чем в мембранах нормальных клеток. Липидный фазовый переход происходил в более широком интервале температур, свидетельствуя об уменьшении кооперативности.

Наличие необычных белков в мембранах клеток GD248, которые были идентифицированы с помощью их биохимических и иммуно-

химических свойств, было подтверждено изменением температуры термоиндуцированного перехода белков, регистрируемого по изменению отношения интенсивности сигнала при 2930 $см^{-1}$ к 2850 $см^{-1}$. Температура перехода в белках мембран опухолевых клеток была на 11 °С ниже, чем в нормальных.

3.3. ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАН ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА

3.3.1. Лекарственная устойчивость

Появление лекарственной устойчивости в опухолевых клеточных популяциях и утрата ими в связи с этим избирательного восприятия токсичности противоопухолевых препаратов являются главной проблемой, с которой сталкиваются клиницисты при химиотерапии злокачественных новообразований (Keiser, Capizzi, 1977; Skeel, Lindquist, 1977). Продолжительное лечение больных лекарствами, к которым их опухоли стали устойчивыми, может привести к дальнейшему снижению терапевтического показателя, так как токсичность этих препаратов для нормальных тканей не компенсируется гибелью опухолевых клеток. Таким образом, методы, позволяющие определять начало появления лекарственной устойчивости в течение лечения, окажутся очень полезными для клинициста.

В течение последних нескольких лет стало очевидным, что определенные типы лекарственной устойчивости могут быть выявлены путем обнаружения специфически измененных клеточных поверхностных гликопротеидов (Juliano, Ling, 1976; Juliano et al., 1976; Beck et al., 1979; Riordan, Ling, 1979). Juliano и сотрудники, изучая клетки яичника китайского хомячка, нечувствительных к действию колхицина, показали перекрестную устойчивость клеток к различным структурно не родственным природным продуктам, таким, как винбластин, дауномицин, пуромицин и цитохалазин В. Основой такой устойчивости явилось снижение проницаемости мембран к этим лекарствам. Такой дефект возник вследствие единичной мутации гена, но степень устойчивости может контролироваться множественными аллелями (Juliano, Ling, 1976).

Были выявлены пять клонов, в которых степень устойчивости к колхицину варьировала от 3 до 180 раз. Плазматические мембраны метили метаболически радиоактивным глюкозамином полностью или только их поверхность с помощью галактозоксидазы — B^3H_4. Выделяли их из лекарственно чувствительных клеток и сравнивали белковый состав с помощью электрофореза в ДНС-полиакриламидном геле. Гликопротеид с высокой молекулярной массой (165—170 кД) был обнаружен в мембранах лекарственно устойчивых клеток, но отсутствовал в мембранах чувствительных к препаратам клеток. Количество этого белка, именуемого *p*-гликопротеидом, коррелирует со степенью лекарственной устойчивости в некоторых, но не всех клонах. *p*-Гликопротеид может составлять не более чем 4 % общего белка плазматической мембраны и действует, как предполагается, путем изменения текучести окружающего его липидного домена

в мембране (Juliano, Ling, 1976). Недавно белок был очищен Riordan и Ling (1979).

Изменения высокомолекулярных гликопротеидов обнаружены в актиномицинустойчивых клетках сирийского хомяка, трансформированных SV 40 (Juliano, Ling, 1976), и в винбластин (ВБЛ)-устойчивых лимфобластах CCRF-CEM лейкемии человека (Beck et al., 1979). Позднее была установлена их перекрестная устойчивость к антрациклинам, в инкристину и эпифиллатоксину. Механизм лекарственной устойчивости в CCRF-CEM-клетках заключается в снижении поглощения и удерживания клетками лекарства. Лекарственно устойчивые клетки CCRF-CEM были получены путем выращивания их в течение 4—6 недель в присутствии ВБЛ. В устойчивых клетках изменялась морфология культуры. Они росли большими, рыхло прикрепленными агрегатами, которых было больше, чем единичных клеток, в суспензии, которая более характерна для лекарственно чувствительных культур. Эти наблюдения позволяют предполагать, что свойства поверхности лекарственно устойчивых клеток изменены по сравнению с клетками, чувствительными к препаратам.

В меченных глюкозамином-или галактозоксидазой-B^3H_4 гликопротеидах мембран и исследованных в ДСН-полиакриламидном геле очевидный пик радиоактивности был обнаружен в белках с молекулярной массой 170—190 кД лекарственно устойчивых клеток. В чувствительных к препаратам клетках эти белки метились значительно меньше, но в оличие от лекарственно устойчивых клеток пик радиоактивности был обнаружен в области белков с молекулярной массой 75—80 кД. Включение метки в высокомолекулярные белки увеличивается в 269 раз по мере повышения резистентности клеток к ВБЛ, хотя при этом не было обнаружено дополнительных изменений. Ревертанты, полученные при выращивании лекарственно устойчивых в отсутствие винбластина клеток, восстанавливают чувствительность к лекарствам параллельно со снижением интенсивности поглощения ВБЛ и реверсии клеточных поверхностных гликопротеидов, характерных для чувствительных к препаратам клеток.

Более вероятно, что изменение состава гликопротеидов в клетках CCRF-CEM происходит скорее вследствие увеличения интенсивности гликозилирования, чем за счет повышения содержания белка, так как различия между лекарственно устойчивыми и чувствительными клетками не были обнаружены путем включения ^3H-лейцина в белки или окрашивания геля кумасси голубым.

Таким образом, молекулярные основы изменений гликопротеидов в клетках CCRF-CEM явно отличаются от изменений гликопротеидов CHO-клеток, в которых меченные ^3H аминокислоты включались в гликопротеид и таким образом увеличивался его уровень. Какая бы ни была их функция в клетках CCRF-CEM, высокомолекулярные белки не несут прямой ответственности за нарушение поглощения лекарств устойчивыми клетками. Обработка этих клеток проназой или туникамицином, полностью удаляющих измененный гликопротеид, не приводит к увеличению чувствительности к ВБЛ и поглощения этого препарата клетками (W. T. Beck, личное сообщение).

3.3.2. Клеточные мембраны: мишени для избирательной противоопухолевой химиотерапии

К настоящему моменту достоверно установлено, что мембраны злокачественных клеток содержат белки, которые или отсутствуют в нормальных мембранах, или подвергаются существенной структурной модификации. Эти необычные гликопротеиды могут нарушать нормальное функционирование мембран и субклеточных органелл, вследствие чего происходит значительное усиление начальных нарушений жизнедеятельности клеток.

Имеется информация о механизмах, с помощью которых синтезируются и встраиваются в мембраны гликопротеиды. Последние могут быть использованы для разработки избирательной противоопухолевой химиотерапии. Основные пути синтеза гликопротеидов млекопитающих кратко суммированы и в общих чертах представлены на рис. 1. Подробно этот вопрос рассмотрен Schachter (1978).

Олигосахаридные цепи гликопротеидов ковалентно прикрепляются к полипептидному скелету с помощью сер(треон)N-ацетил-О-галактозамин (О-гликозид муцинового типа) и асп-Nацетил-О-глюкозамин (N-гликозид плазменного типа)-связей. Олигосахаридные цепи могут быть присоединены непосредственно к полипептидному скелету или опосредованно — через предварительное присоединение к полиизопренолу (обычно долихолу), переносящему их к белку. Последовательность и связи сахаров в индивидуальных олигосахаридных цепях осуществляются с помощью семейства ферментов-гликозилтрансфераз, которые находятся в гладком и гранулярном эндоплазматическом ретикулуме и мембранах аппарата Гольджи и катализируют перенос сахаров из предшественников—нуклеотидных сахаров — к нововосстановленным концам растущих олигосахаридных цепей. Характерны следующие этапы синтеза гликопротеидов, потенциально чувствительные к генетическим или фармакологическим вмешательствам, т. е. этапы регуляции биосинтеза гликопротеидов, нарушения в которых могут приводить к образованию аномально гликолизированных мембранных белков:

1-й — поглощение клеткой, активация и взаимопревращение моносахаридов	Hatanaka, 1974; Pouyssegur et al., 1977; Ginsburg, 1978; Stoddart, 1979
2-й — биосинтез моносахаридов	Winterburn, Phelps, 1971; 171a; Kent, Mora, 1973
3-й — синтез долихолов или долихолигосахаридов	Molnar, Bekesi, 1972; Tkacz, Lampen, 1975; Struck, Lennarz, 1977; Schwarz et al., 1979
4-й — перенос олигосахаридов от долихола к белку	Beeley, 1977; Jika et al., 1977; Turco et al., 1977; Kronquist, Lennarz, 1978

Образование нуклеозиддифосфатсахаров

UDPGlc, UDPGlcNAc, UDPGalNAc, UDPGal, GDPMan, GDPFuc, CMPNANA

Сборка олигосахаридных цепей

1 Взаимодействие сахаров с долихоловым переносчиком: N-гликозилирование

2 Присоединение сахаров к полипептидной цепи: O-гликозилирование

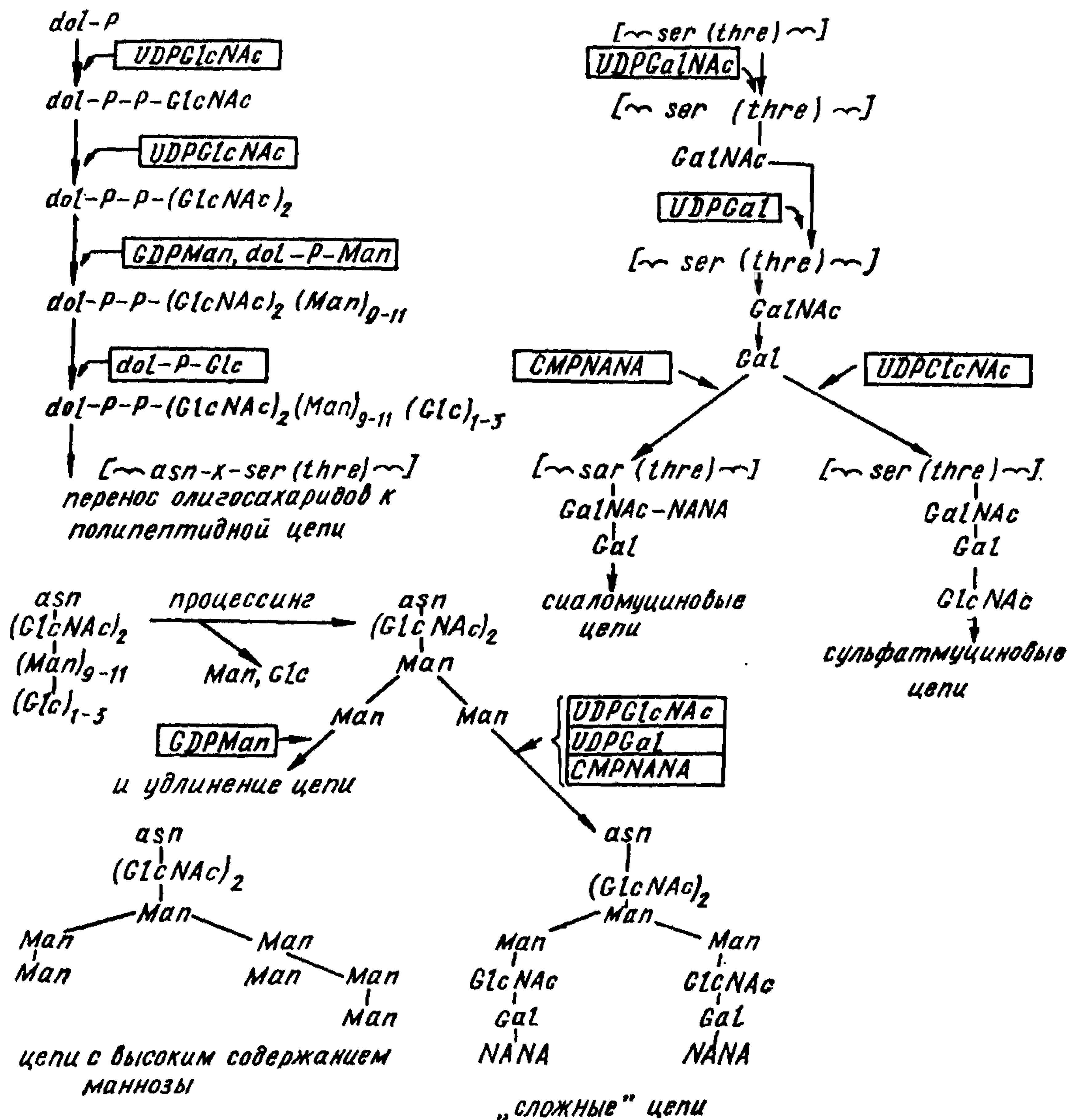


Рис. 1. Метаболические пути биосинтеза гликопротеидов. Сокращения: *Glc* — глюкоза; GlcNAc — *N*-ацетил-O-глюкозамин; GalNAc— *N*-ацетил-*D*-галактозамин; *Gal* — галактоза; *Man* — манноза; Fuc — фукоза; *NANA* — *N*-ацетилнейраминовая кислота, сиаловая кислота; *dol* — долихол; *asn*— аспарагин; *ser* — серин; *thre* — треонин. (Составлено на основании следующих данных литературы: Winzler (1973), Hemming (1974), Waechter, Lennarz, (1976), Robbins e. a., (1977).

5-й —	процессинг олигосахаридов, прикрепленных к белку	Warren et al., 1972; Ceccarini et. al., 1975; Gottlieb et al., 1975; Stanley et al., 1975; Ogata et al., 1976; Narasimhan et al., 1977; Robbins et al., 1977; Tabas et al., 1978

3.3.1.1. Избирательная токсичность противоопухолевых препаратов

Препараты, которые в настоящее время используются в клиническом лечении рака, имеют малую избирательность (Sartorelli, Johns, 1975; Clarysse et al., 1976) и вызывают множественные токсические побочные эффекты в пролиферирующих нормальных тканях больного. Улучшение терапевтического эффекта достигается путем, использования комбинаций лекарств, имеющих различные механизмы действия и не перекрывающихся по токсичности, оптимизации доз этих лекарств и схем введения, а также с помощью избирательной защиты нормальных тканей от лекарственной токсичности (Keiser, Capizzi, 1977). Успех всех этих мероприятий ограничен, поэтому создание лекарств с присущей им избирательной токсичностью к опухолям насущно и необходимо для лечения новообразований.

Часто наблюдаемые изменения гликопротеидов в мембранах малигнизированных клеток позволяют полагать, что дефект регуляции синтеза гликопротеидов можно использовать для химиотерапевтических целей. Технические возможности использования различий гликопротеидов, принадлежащих мембранам нормальных и трансформированных клеток, для целей химиотерапии заключаются в следующем:

1) использовать аналоги нуклеотидных сахаров в качестве конкурентных ингибиторов синтеза моносахаридов, их взаимопревращения и реакции переноса сахаров (Shin et al., 1975; Bernacki et al., 1978);

2) использовать аналоги сахаров и нуклеотидных сахаров как ложные субстраты гликозилтрансфераз для их включения в молекулы, принадлежащие мембранам (Steiner et al., 1973; Steiner, Steiner, 1973; Hughes et al., 1977; Bernacki et al., 1978);

3) препятствовать гликозилированию посредством долихола, ингибируя его (Mills, Adamany, 1978) или долихололигосахаридный синтез (Tkacz, Lampen, 1975; Schwarz et al., 1979; Elbein et al., 1979);

4) использовать мембраноактивные лекарства в комбинации с аминосахаром —D-глюкозамином, сочетание которых ведет к искажению многих метаболических процессов в мембранах и разрушению мембранной интеграции (Friedman, 1979; Friedman, Skehan, 1980).

Генетические или фармакологические препятствия гликозилирования белка могут приводить к дефектам клеточной поверхности и свойств мембран. Мутация в AD 6 BALB/c 3T3 клетках приводила

к потере фермента, который катализирует ацетилирование D-глюкозамин-6-фосфата, и соответственно к дефектам белкового гликозилирования (Pouyssegur, Pastan, 1976). По сравнению с обычным типом этих клеток мутанты имели другую морфологию поверхности, адгезию, экспонированность гликопротеидов на клеточной поверхности, способность агглютинировать с лектинами и различия содержания не полностью гликозилированных гликопротеидов на клеточной поверхности. Некоторые такие изменения поверхности происходят в клетках, обработанных ингибиторами гликозилирования — туникамицином (Duksin, Bornstein, 1977; Olden et al., 1979), 2-дезоксиглюкозой (Hughes et al., 1977; Myers-Robfogel er al., 1979) и D-глюкозамином (Carber, 1963; Leoyd, Kemp, 1971; Kaluza et al., 1973; Kuroda, 1974; Scholtissek et al., 1975; Friedman, Skehan; неопубликованные данные). В дополнение к этому у обработанных препаратами клеток выявились изменения транспорта или поглощения нуклеозидов (Friedman et al., 1977), аналогов аминокислот (Olden et al., 1979) и сахаров (Olden et al., 1979), а также метаболизма глюкозы (Lloyd, Kemp, 1971; Sukeno et al., 1971, Tesoriere et al.; 1975; Olden et al., 1979).

При определении влияния любых индуцированных лекарствами изменений на повреждение гликозилирования нужно соблюдать осторожность, особенно в случае применения сахаров с низкой молекулярной массой — дезоксиглюкозы и глюкозамина, которые изменяют многие метаболические пути. Вместе с тем не случайно, что глюкозамин и глюкозамин-содержащие антибиотики, в частности туникамицин, обладают избирательной токсичностью как к культивируемым линиям опухолевых клеток, так и растущим in vivo опухолям (Quastel, Cantero, 1953; Rubin et al., 1954; Fjelde et al., 1956; Ball et al., 1957; Linder et al., 1960; Bekesi et al., 1969; 1969a; Bekesi, Winzler, 1970; Rosmann, 1971; Molnar, Bekesi, 1972, 1972a; Helson et al., 1979; Friedman, Skehan, 1980), а также к линиям инфицированных вирусами клеток (Olden et al., 1979). Недавно в нескольких лабораториях (Friedman, Skehan, 1980; Olden et al., 1979) исследовались механизмы избирательной токсичности глюкозамина и туникамицина. Полученные к настоящему времени данные кратко суммированы ниже.

Туникамицин. Он блокирует образование долихол-PP-N-ацетил-D-глюкозамин — первый этап в долихолзависимом пути гликозилирования (см. рис. 1) (Tkacz, Lampen, 1975; Struck, Lennarz, 1977). Несколько лабораторий сообщили, что туникамицин ингибирует жизнеспособность клеток, инфицированных онкогенными вирусами. Концентрация ингибирования соответствует концентрации, при которой ингибируется рост, но она не является летальной как для нормальных эмбриональных клеток цыпленка, так и для некоторых стабильных клеточных линий (Takasuki et al., 1976; Duksin, Bornstein, 1977; Olden et al., 1979). Это привело к предположению, что туникамицин избирательно токсичен по отношению к онкогенно трансформированным клеткам (Olden et al., 1979). Хотя известно, что не существует линии, которая могла бы быть использована для

прямого определения способности к опухолеобразованию in vivo, в каждом цитируемом исследовании служили в качестве «нормального контроля» одна или более стабильных линий, проверенных на опухолеобразование при помощи анализа Буна (Boone et al., 1976). Поэтому в настоящее время идея эффективности туникамицина в избирательной противоопухолевой химиотерапии остается в основном спекулятивной. Действие туникамицина на жизнеспособность клеток определялось в экспериментах с эмбриональными клетками цыпленка, нормальными крысиными клетками почки (NRK), 3T3 клетками мышей линии BALB/c, WI-38 человеческих фибробластов и их производных, полученных обработкой химическими агентами, вирусами, облучением (Olden et al., 1979). Показателями жизнеспособности клеток служили: отсутствие окрашивания трипановым синим, возобновление роста после удаления препарата из клеточной культуры и способность трипсиноразделенных плавающих клеток к образованию колоний на пластиковых чашках для тканевых культур. Влияние туникамицина на клеточный метаболизм изучалось на основании анализа включения меченных тритием маннозы и лейцина в кислый осадок клеточных макромолекул, поглощения клетками 2-дезоксиглюкозы, превращения ^{14}C-глюкозы в $^{14}CO_2$. Рост клеток в мягком агаре служил в качестве грубого теста онкогенной трансформации. Следует отметить, что имеются определенные причины для сомнения обоснованности теста — роста клеток в мягком агаре — как показателя онкогенной трансформации (гл. 2).

В большинстве экспериментов с туникамицином клеточная выживаемость определялась исключительно по окрашиванию трипановым синим. Хотя этот тест определяет способность клеток к окрашиванию, он в общем характеризует их переживаемость как показатель жизнеспособности (Bhugan et al., 1976; Roper, Drewinko, 1976). С помощью теста с трипановым синим было обнаружено, что три линии из 11, которые, вероятно, трансформировались, были проницаемыми к красителю после 36-часовой экспозиции в туникамицине (0,05 мг/мл), LD_{50} для линий, чувствительных к препаратам, оценивалось по результатам выращивания колоний в чашках для тканевых культур в присутствии (0,02—0,03) мг/мл туникамицина. Три стабильные линии оказались относительно неустойчивыми к метаболическому действию препаратов. Клетки, трансформированные температурочувствительными мутантами вирусов саркомы Рауса (Kawai, Hanafusa, 1971; Martin, 1971), были сравнительно устойчивы к туникамицину, если росли при непермиссивных температурах, но погибали при пермиссивной температуре культивирования. Рост различных типов эмбриональных клеток цыпленка и стабильных клеточных линий, которые не подвергались трансформирующему действию, обратимо ингибировался туникамицином, концентрация которого токсична для клеток, инфицированных вирусами.

Хотя клетки всех линий после 9-часовой обработки туникамицином (концентрация 0,05 мг/мл среды) не окрашивались трипановым синим, отмечалось торможение включения в клеточные макромолекулы ^{3}H-маннозы и ^{3}H-лейцина. Скорость включения маннозы

была снижена на 93—99 %, а лейцина на 3—26 %. Спустя 24 ч, когда клетки инфицированных вирусами линий (а не нормальные эмбриональные клетки) окрашивались трипановым синим, в них наблюдалось относительное ингибирование поглощения 2-дезоксиглюкозы и метаболизма глюкозы.

На основании этих результатов Olden и соавт. (1979) предположили, что преимущественная токсичность туникамицина для трансформированных клеток обусловлена ингибированием гликозилирования, а наблюдаемая селективность препаратов может являться результатом различной чувствительности нормальных и трансформированных клеток к снижению метаболизма глюкозы и транспорту питательных веществ. Однако отсутствие теста на опухолеобразование используемых линий и возможная ошибка при классификации линии 3Т3 как нормальной позволяют сомневаться в справедливости этих выводов.

Хотя еще не определена противоопухолевая активность туникамицина in vivo, маловероятно, что он будет обладать избирательным токсическим действием на опухоли, учитывая его ингибирующий эффект на гликозилирование и секрецию в нормальных тканях.

Глюкозамин. Противоопухолевая активность D-глюкозамина — естественного аминосахара — была впервые продемонстрирована в 1953 г. исследованиями Quastel и Cantero (1953) на мышах, инфицированных с саркомой 37. С тех пор показано, что глюкозамин избирательно лизирует несколько типов перевивных опухолей животных (Ball et al., 1957; Lindlar et al., 1960; Bekesi et al., 1969a; Bekesi, Winzler, 1970; Monlar, Bekesi, 1972) и опухолей человека, пересаженных на бестимусных безволосых мышей nude (L. Helson, личное сообщение), незначительно влияя или не оказывая токсического влияния на нормальные ткани организма-хозяина. Хорошо установлено цитотоксическое действие глюкозамина на злокачественные клетки в культуре ткани (Rubin et al., 1954; Fjelde et al., 1956; Bekesi et al., 1969a; Bosmann, 1971; Monlar, Bekesi, 1972; Friedman, Skehan, 1980). В нескольких работах, проведенных на нормальных эмбриональных клетках (Ely et al., 1953; Scholtissek, 1972), было показано, что концентрации глюкозамина, которые вызывают необратимые повреждения опухолевых клеток, не влияют на жизнеспособность нормальных.

Механизм цитотоксического действия глюкозамина еще не понятен. Образование метаболитов аминосахаров в клетках, обработанных высокими концентрациями глюкозамина (10—20 мМ), может привести к развитию многих биохимических и морфологических повреждений. Глюкозамин обладает широким спектром действия на клетки. Он ингибирует следующие процессы; включение низкомолекулярных предшественников в белки, РНК и ДНК (Bekesi et al., 1969; Bosmann, 1971, 1972; Molnar, Bekesi, 1972a; Friedman et al., 1977, 1977a), поглощение и фосфорилирование уридина и тимидина (Friedman et al., 1977a), метаболизм тимидина в предварительно нагруженных им клетках (Friedman et al., 1977a), активность тимидинкиназы (Friedman et al., 1977), гликолиз (Tesoriere et al.,

1975; Tabas et al., 1978) и гликогенолиз в некоторых клетках (Sukeno et al., 1971; Lorer, 1975), синтез вирусных гликопротеидов (Scholtissek, 1975; Scholtissek et al., 1975), агглютинацию конканавалином инфицированных вирусами клеток (Kaluza et al., 1973), слияние NDV-инфицированных клеток (Scholtissek, 1975), агрегацию клеток (Lloyd, Kemp, 1971, Kuroda, 1974), клеточную сортировку эмбриональных клеток печени цыпленка (Garber, 1963), включение ацетата в липиды клеток (Friedman, Skehan, 1980), синтез стерола из ацетата (Friedman, Skehan, 1978, 1980). Кроме того глюкозамин изменяет ультраструктуру клеточных органелл и мембран (Molnar, Bekesi, 1972; 1972a; Friedman, Skehan, 1978, 1980), а так же состав гликолипидов поверхности клеток (Friedman, Skehan, 1978; 1980), снижает уровень АТФ и УТФ в некоторых клетках (Bekesi, Winzler, 1969; Sukeno et al., 1971; Bosmann, 1971; Scholtissek, 1972; Plagemann, Erbe, 1973).

Наиболее ранние и более заметные изменения происходят в клеточных мембранах (Friedman, Skehan, 1978; 1980). Отмечаются изменения, появляющиеся в ультраструктуре внутренних мембран клеток крысиной глиомы С6 после их обработки в течение 1—3 ч цитотоксическими концентрациями (20 мМ) глюкозамина (рис. 2, см. вклейку). Шероховатый эндоплазматический ретикулум становится фрагментированным.

Наружные мембраны ядер и вакуолей выпячиваются и образуют мембранные вакуоли, которые вместе с каплями липидов накапливаются в цитоплазме. Комплексы Гольджи значительно увеличиваются, особенно в перинуклеарной области. Когда начинается лизис (24 ч), морфологическая интеграция плазматической мембраны еще сохраняется. Однако пузырьки, везикулы пиноцитозного типа и омега-тельца более часто наблюдаются в обработанных препаратом клетках, чем необработанных.

Клеточное поглощение и обмен пиримидиновых нуклеотидов быстро ингибируются, наводя на мысль, что мембранный транспорт изменен (Friedman et al., 1977a). Так как пиримидинуклеозидкиназа также ингибируется обработкой глюкозамином, нельзя однозначно утверждать, что мембраны — единственно ответственны за цитоксический эффект глюкозамина.

Концентрации *p*-глюкозамина, составляющие 1—10 мМ, вызывают торможение роста и обратимые повреждения в С6 глиомах (рис. 3, см. вклейку; неопубликованные данные). Спустя 6 ч после добавления 10 мМ глюкозамина к культурам клеток наблюдаются значительные изменения метаболизма гликопротеидов и липидов. Синтез гликопротеидов ингибируется, возможно, на уровне образования долихололигосахаридов, поскольку ^{3}H-глюкозамин медленнее включается во фракцию полярных липидов, экстрагированных смесью хлороформ : метанол : вода (1 : 1 : 0,3 по объему; S. I. Friedman, неопубликованные эксперименты). ^{3}H-глюкозамин включался в нейтральные гликолипиды и ганглиозиды в обработанных и не обработанных препаратом клетках. Состав меченых липидов, как показали данные тонкослойной хроматографии, был изменен в

Таблица 3. **Мембраноактивные препараты, усиливающие лизис клеток, индуцированный глюкозамином**

Препарат	Химический класс	Фармакологическое использование
Лидокаин	Ароматический амин	Местный анестетик
Адифенин	Ароматический амин	Релаксант гладкой мускулатуры
Хлорпротиксен	Тиоксантин	Транквилизатор
Тиоридазин	Фенотиазин	»
Папаверин	Бензилизохинолин	Релаксант гладкой мускулатуры
Галоперидол	Бутирофенон	Депрессант ЦНС, транквилизатор
Кетамин	Циклогексанон	Анестетик

обработанных препаратом культурах (Friedman, Skehan, 1978). Включение (2-^{14}C)-ацетата в общие липиды клеток ингибировалось, состав меченых нейтральных гликолипидов и липидов изменялся (Friedman, Skehan, 1978, 1980). Наиболее выраженные нарушения метаболизма нейтральных липидов отмечены при включении (2-^{14}C)-ацетата в стерины (десмостерин + холестерин) и неидентифицированные липиды, их метаболизм избирательно ингибировался (рис. 4). При хроматографии неидентифицированный липид на пластинке, покрытой силикагелем G, в системе растворителей для нейтральных липидов двигался рядом с холестерином, но располагался ниже него (Freeman, West, 1966). Его можно отделить от холестерина в системе хлороформ : ацетон (75 : 25 по объему; S. I. Friedman, неопубликованные наблюдения). Предварительная идентификация, сделанная с помощью масс-спектрометрии, позволяет предположить, что неизвестный липид является окисленным углеводородом с молекулярной массой 400 Д (Fennessey, Friedman, неопубликованные эксперименты).

Связь между изменениями мембран и цитотоксичностью глюкозамина была в дальнейшем исследована путем биохимического и цитотоксического анализов действия глюкозамина в комбинации с мембраноактивными препаратами (Friedman, 1979; Friedman, Skehan, 1980).

Лидокаин — местный анестетик с минимальной токсичностью к клеткам тканевой культуры — обратимо ингибирует рост С6-глиомы при концентрации 2,5 мМ или меньше, но усиливает торможение роста и литическое действие глюкозамина (см. рис. 3).

С помощью изобаллограммного анализа был обнаружен синергизм взаимодействия этих препаратов (Friedman, Skehan, 1980). Испытывали действие одного лидокаина или его комбинации с глюкозамином (10 мМ) на включение меченого глюкозамина или ацетата в гликопротеиды и гликолипиды. Лидокаин не действовал на синтез гликолипидов и гликопротеидов. Культуры, обработанные одновременно обоими препаратами, вели себя одинаково с культурами, об-

работанными только глюкозамином. Результаты влияния препаратов на синтез нейтральных липидов были более интересны. Через 1—3 ч после обработки клеток 2,5 мМ лидокаином отмечалось избирательное ингибирование синтеза стеринов (рис. 4) (Friedman u Skehan, 1979a). Предполагается, что лидокаин может препятствовать включению экзогенных и эндогенных стеринов в клеточные мембраны, так как скорость поглощения (^{3}H)-холестерина затормозилась на 75 %. Одновременная обработка клеток культуры лидокаином и глюкозамином вызывала быстрое и выраженное торможение включения (^{14}C)-ацетата в стерины и неидентифицированную фракцию липидов (рис. 4, см. вклейку).

Были испытаны и другие мембраноактивные препараты с отличающимися от лидокаина структурными и фармакологическими характеристиками, известные как обладающие местным анестезирующим действием (табл. 3). Нецитотоксические концентрации этих препаратов ингибировали синтез стеринов и поглощение холестерина, а также усиливали лизис клеток под влиянием глюкозамина (Friedman, 1979; Friedman, Skehan, 1979a, 1980).

Полученные в настоящее время результаты показали, что глюкозамин вызывает ранние изменения ультраструктуры, обмена и функции мембран. Мы полагаем, что ингибирование синтеза стеринов и неидентифицированных липидов — необходимое звено цитотоксического действия глюкозамина. Различия способностей нормальных и опухолевых клеток поглощать и метаболизировать глюкозамин или восстанавливать сублетальные повреждения, вызванные препаратом, могут объяснить избирательную токсичность глюкозамина для опухолей in vivo. С другой стороны, нормальные и опухолевые клетки могут различаться их потребностью в стеринах или регуляцией синтеза стеринов. Нарушение регуляции синтеза холестерина наблюдается во многих типах опухолей (Fumagalli et al., 1964; Sabine, 1977; Chen et al., 1978).

Wallach и соавт. (1977) доказали, что микроокружение в мембранах опухолевых клеток фермента — оксиметилглютарил-СоА-редуктазы,— лимитирующего скорость синтеза стеринов, отличается от нормальных.

Хотя в большинстве исследований использовалась С6 глиома, чувствительными к действию некоторых препаратов в комбинации с глюкозамином оказались также Р815- и RL-мастоцитомы, линия лейкозных клеток мышей, индуцированных облучением (S. T. Friedman, P. Skehan, неопубликованные данные).

Гетеротрансплантированные in vivo, выращенные in vitro клетки опухоли мозга, меланом, нейробластом погибали под влиянием таких концентраций папаверина в смеси с глюкозамином, которые вызывают незначительное токсическое действие на организм хозяина (L. Helson, личное сообщение). Интрацеребральное введение мышам, которым была привита в мозг лимфобластома L517 8Y, хлорпромазина с глюкозамином приводило к значительному увеличению продолжительности жизни без существенного токсического влияния на организм (M. Y. Chu, личное сообщение). Используемые в наших

исследованиях препараты способны преодолевать гематоэнцефалический барьер. Они высокоэффективны против опухолей из нервной ткани и глии (нейробластом и глиом). Остается ожидать появления препаратов, обладающих избирательным токсическим действием на опухоли центральной нервной системы человека.

3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные мембраны претерпевают различные изменения в течение и после трансформации клеток в злокачественные. Изменение состава гликопротеидов — всего лишь одно из многих изменений, которые определяются в мембранах трансформированных и злокачественных клеток. Необходимо приложить значительные усилия специалистов различных областей исследования прежде, чем станет понятна роль обнаруженных изменений мембран в процессе малигнизации. Первичные повреждения, возможно, причинносвязанные с трансформацией нормальных клеток в злокачественные, необходимо выделить из вторичных, появляющихся в процессе роста и прогрессии опухолей. Должны быть определены функциональные и структурные последствия в молекулах мембран. Наконец (вероятно, наиболее важное), должны быть разъяснены молекулярные основы ненормальных клеточных взаимодействий, служащих характеристикой и определяющих поведение злокачественных клеток.

3.5. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agnew W. S., Raftery M. A.* (1979). Solubilized tetrodotoxin binding component from the Electroplax of Electrophorus electricus. Stability as a function of mixed lipid detergent micelle composition. Biochemistry 18, 1912—1919.
2. *Ali I. U., Mautner V., Ranza R., Hynes R. O.* (1977). Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation-sensitive surface, protein. Cell 11, 115—126.
3. *Aloia R.C., Pengelley E. T., Bolen J. L., Rouser G.* (1974). Changes in phospholipid composition in hibernating ground squirrel. Citellis lateralis, and their relationships to membrane function at reduced temperatures. Lipids 9, 993—999.
4. *Asch B. B.* (1979). Deposition of the large external transformation sensitive (LETS) protein in cultures of normal and neoplastic mouse mammary cells. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 131.
5. *Ashwell G., Morell A. G.* (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition of circulating glycoproteins. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 41, 99—128.
6. *Atkinson P. H.* (1973). HeLa cell plasma membranes. Methods Cell Biol. 7, 157—188.
7. *Aubert J. P., Biserte G., Loucheux—Lefebre M. H.* (1976). Carbohydrate—peptide linkage in glycoproteins. Arch. Biochem. Biophys. 175, 410—418.
8. *Ball H. A., Wick A. N., Sanders C.* (1957). Influence of glucose antimetabolites on the Walker tumor. Cancer Res. 17, 235—239.
9. *Beck W. T., Mueller T. J., Tanzer L. R.* (1979). Altered surface membrane glycoproteins in Vinca alkaloid-resistant leukemic lymphoblasts. Cancer Res. 39, 2070—2076.
10. *Beeley J. G.* (1977). Peptide chain conformation and the glycosylation and the glycosylation of glycoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1051—1055.

11. *Bekesi J. G., Bekesi E., Winzler R. J.* (1969). Inhibitory effect of D-glucosamine and other sugars on the biosynthesis of protein, ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid in normal and neoplastic tissues. J. Biol. Chem. 244, 3766—3772.
12. *Bekesi J. G., Molnar Z., Winzler R. J.* (1969 a). Inhibitory effect of D-glucosamine and other sugar analogs on the viability and transplantability of ascites tumor cells. Cancer Res. 29, 353—359.
13. *Bekesi J. G., Winzler R. J.* (1969). The effect of D-glucosamine on the adenine and uridine nucleotides of Sarcoma 180 ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 244, 5663—5668.
14. *Bekesi J. G., Winzler R. J.* (1970). Inhibitory effects of D-glucosamine on the growth of Walker 256 carcinosarcoma and protein, RNA, and DNA synthesis. Cancer Res. 30, 2905—2912.
15. *Bernacki R., Porter C., Korytnyk W., Mihich E.* (1978). Plasma membrane as a site for chemotherapeutic intervention. Adv. Enzyme Regul. 16, 217—237.
16. *Bhuyan B. K., Loughman B. E., Fraser T. J., Day K. J.* (1976). Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. Exp. Cell. Res. 97, 275—280.
17. *Birrell G. B., Griffith O. H.* (1976). Cytochrome induced lateral phase separation in a diphosphatidylglycerol-steroid spin label model membrane. Biochemistry 15, 2925—2929.
18. *Boone C. W., Takeichi N., Paranjpe M., Gilden R.* (1976). Vasoformative sarcomas arising from BALB/3T3 cells attached to solid substrates. Cancer Res. 36, 1626—1633.
19. *Bornstein P., Ash J. F.* (1977). Cell surface-associated structural proteins in connective tissue cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 2480—2484.
20. *Bornstein P., Duksin D., Balian G., Davidson J. M., Crouch E.* (1978). Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: Relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 93—105.
21. *Bosmann H. B.* (1971). Inhibition of protein, glycoprotein, ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis by D-glucosamine and other sugars in mouse leukemic cells L 5178Y and selective inhibition in SV-3T3 compared with 3T3 cells. Biochim. Biophys. Acta 240, 74—93.
22. *Bosmann H. B.* (1972). Antineoplastic drug activity in the mitotic cycle: Effects of six agents on macromolecular synthesis in synchronous mammalian leukemic cells. Biochim. Pharmacol. 21, 1977—1988.
23. *Bosmann H. B., Bieber G. F., Brown A. E., Case K. R., Gersten D. M., Kimmerer T. W., Lione A.* (1973). Biochemical parameters correlated with tumour cell implantation. Nature (London) 246, 487—489.
24. *Bramwell M. E., Harris H.* (1978). An abnormal membrane glycoprotein associated with malignancy in a wide range of different tumors. Proc. R. Soc. London, Ser. B. 201, 87—106.
25. *Bramwell M. E., Harris H.* (1978a). Some further information about the abnormal membrane glycoprotein associated with malignancy. Proc. R. Soc. London, Ser. B 203, 93—99.
26. *Bretscher M. S.* (1974). Some aspects of membrane structure. In «Perspectives in Membrane Biology» (S. Estrada-O. and C. Gitler, eds.), pp. 3—24. Academic Press, New York.
27. *Brunson K. W., Nicolson G. L.* (1978). Selection and biologic properties of malignant variants of a murine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 61, 1499—1504.
28. *Buck C. A., Fuhrer J. P., Soslau G., Warren L.* (1974). Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells. J. Biol. Chem. 249, 1541—1555.
29. *Burridge K.* (1976). Changes in cellular glycoproteins after transformation: Identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 4457—4461.
30. *Cafferata R., Panosian J., Bordley G.* (1979). Developmental and biochemical studies of adhesive specificity among embryonic retinal cells. Dev. Biol. 69, 108—117.

31. *Capaldi R. A., Vanderkooi G.* (1972). The low polarity of many membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 930—932.
32. *Carraway C. A., Huggins J. W., Carraway K. L.* (1979). Isolation of branched microvilli from an ascites subline of a rat mammary adenocarcinoma. J. Cell. Biol. 83, 72a.
33. *Carraway K. L., Huggins J. W., Sherblom A. P., Chesnut R. W., Buck R. L., Howard S. P., Ownby C. L., Carraway C. A.* (1978). Membrane glycoproteins of rat mammary gland and its metastasizing and non-metastasizing tumors. In «Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes» (E. F. Walborg, Jr., ed.), Symposium Series, No. 80, pp. 432—445. Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
34. *Carraway K. L., Sherblom A. P.* (1979). Sulfate incorporation into the major glycoprotein of an ascites mammary adenocarcinoma subline. J. Cell Biol. 83, 72 a.
35. *Carter W. G., Fukuda M., Lingwood C., Hakomori S.-I.* (1978). Chemical composition, gross structure, and organization of transformation-sensitive glycoproteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 160—177
36. *Ceccarini C.* (1975). Appearance of smaller mannosyl-glycopeptides on the surface of a human cell transformed by simian virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 2687—2690.
37. *Ceccarini C., Muramatsu T., Tsang J., Atkinson P. H.* (1975). Growth-dependent alterations in oligomannosyl cores of glycopeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3139—3143.
38. *Changeux J.-P., Thiery J., Tung Y., Kittel. C.* (1967). On the cooperativity of biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 57, 335—341.
39. *Changeux J.-P., Thiery J.* (1968). On the excitability and cooperativity of biological membranes. In «Regulatory Functions of Biological Membranes» (J. Jarnefelt, ed.), B. B. A. Library, Vol. 11, pp. 116—138. Elsevier, Amsterdam.
40. *Chapman D., Gomez-Fernandez J. C., Goni F. M.* (1979). Intrinsic protein-lipid interactions: Physical and biochemical evidence. FEBS Lett. 98, 211—223.
41. *Chen H. W., Kandutsch A. A., Heiniger H. J.* (1978). The role of cholesterol in malignancy. Prog. Exp. Tumor Res. 22, 275—316.
42. *Chen L. B., Maitland N., Gallimore P. H., McDougall J. K.* (1977). Detection of the large external transformation-sensitive protein on some epithelial cells. Exp. Cell Res. 106, 39—46.
43. *Chen L. B., Burridge K., Murray A., Walsh M. L., Copple C. D., Bushnell A.* (1978). Modulation of cell surface glycocalyx studies on large, external, transformation-sensitive protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 366—381.
44. *Chen L. B., Gallimore P. H., McDougall J. K.* (1967). Correlation between tumor induction and the large external transformation-sensitive protein on the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3570—3574.
45. *Cherry R. J., Burkli A., Busslinger M., Schneider G.* (1977). Rotational diffision of proteins in membranes. In «Biochemistry of Membrane Transport» (G. Semenza and E. Carafoli, eds.), FEBS Symposium, No. 42, pp. 86—95. Pergamon, Oxford.
46. *Clamp J. R.* (1974). Analysis of glycoproteins. Biochem. Soc. Symp. 40, 3—16.
47. *Claryssе A., Kenis Y., Mathe G.* (1976). Application of the basic principles of chemotherapy to human malignancies. Recent Results Cancer Res. 53, 130—163.
48. *Codington J. F., Sanford B. H., Jeanloz R. W.* (1973). Cell-surface glycoproteins of two sublines of the TA3 tumor. J. Natl. Cancer Inst. 51, 585—591.
49. *Codington J. F., Cooper A. G., Brown M. C., Jeanloz R. W.* (1975). Evidence that the major cell surface glycoprotein of the TA3-Ha carcinoma contains the Vicia graminea receptor sites. Biochemistry 14, 855—859.
50. *Codington J. F., Linsley K. B., Jeanloz R. W., Irimura T., Osawa T.* (1975 a). Immunochemical and chemical investigations of the structure of glycoprotein fragments obtained from epiglycanin, a glycoprotein at the surface of the TA3-Ha cancer cell. Carbohydr. Res. 40, 171—182.
51. *Codington J. F.* (1978). Masking of cell-surface antigens by ectoglycoproteins. In «Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes» (E. F. Walborg, Jr.,

ed.), Symposium Series, No. 80, pp. 277—294. Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
52. *Codington J. F., Klein G., Cooper A. G., Lee N., Brown M. C., Jeanloz R. W.* (1978). Further studies on the relationship between large glycoprotein molecules and allotransplantability in the TA3 tumor of the mouse: Studies on segregating TA3-Ha hybrids. J. Natl. Cancer Inst. 60, 811—818.
53. *Codington J. F., Cooper A. G., Miller D. K., Slayter H. S., Brown M. C. Silber C., Jenaloz R. W.* (1979). Isolation and partial characterization of an epiglycanin-like glycoprotein from a new non-strain-specific subline of TA3 murine adenocarcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 63, 153—160.
54. *Cone R. A.* (1972). Rotational diffisuion of rhodopsin in the visual receptor membrane. Nature (London), New Biol. 236, 39—43.
55. *Cook G. M. W.* (1976). Techniques for the analysis of membrane carbohydrates. In «Biochemical Analysis of Membranes» (A. H. Maddy, ed.), pp. 283—351. Wiley, New York.
56. *Cooper A. G., Codington J. F., Brown M. C.* (1974). In vivo release of glycoprotein I from the Ha subline of TA3 murine tumor into ascites fluid and serum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1224—1228.
57. *Cooper A., Morgello S., Miller D., Brown M.* (1977). Role of surface glycoproteins in tumor growth. In «Cancer Invasion and Metastasis: Biologic Mechanisms and Therapy» (S. B. Day et al., eds.), pp. 49—64. Raven, New York.
58. *Cooper A. G., Codington J. F., Miller D. K., Brown M. C.* (1979). Loss of strain specificity of the TA-3-St subline: Evidence for the role of epiglycanin in mouse allogeneic tumor growth. J. Natl. Cancer Inst. 63, 163—169.
59. *Cooper R. A.* (1977). Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. N. Engl. J. Med. 297, 371—377.
60. *Critchley D. R., Vicker M. G.* (1977). Glycolipids as membrane receptors important in growth regulation and cell—cell interactions. In «Dynamic Aspects of Cell Surface Organization» (G. Poste and G. L. Nicholson, eds.), pp. 307—370. North—Holland Publ., Amsterdam.
61. *Culp L. A.* (1976). Electrophoretic analysis of substrate-attached proteins from normal and virus-transformed cells. Biochemistry 15, 4094—4104.
62. *Cunningham C. C., Hager L. P.* (1971). Crystalline pyruvate oxidase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 246, 1575—1582.
63. *Darke A., Finer E. G., Flook A. G., Phillips M. C.* (1972). Nuclear magnetic resonance study of lecithin-cholesterol interactions. J. Mol. Biol. 63, 265—279.
64. *deKruyff B., van Dijck P. W. M., Demel R. A., Schuijff A., Brants F., van Deenan L. L. M.* (1974). Nonrandom distribution of cholesterol in phosphatidylcholine bilayers. Biochim. Biophys. Acta 356, 1—7.
65. *DePierre J. W., Ernster L.* (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. Annu. Rev. Biochem. 46, 201—262.
66. *Der C., Stanbridge E.* (1978). Lack of correlation between the decreased expression of cell surface LETS protein and tumorigenicity in human cell hybrids. Cell 15, 1241—1251.
67. *Duksin D., Bornstein P.* (1977). Changes in surface properties of normal and transformed cells caused by tunicamycin, an inhibitor of protein glicosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3433—3437.
68. *Edidin M.* (1974). Rotational and translational diffusion in membranes. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 3, 179—201.
69. *Edsall T. T., Gilbert G. A., Scheraga H. A.* (1955). The non-clotting component of the human plasma fraction I-1 («cold insoluble globulin»). J. Am. Chem. Soc. 77, 157—161.
70. *Edwards J. G., Dysart J. M., Hughes R. C.* (1976). Cellular adhesiveness reduced in ricin-resistant hamster fibroblasts. Nature (London) 264, 66—68
71. *Elbein A. D., Gafford J., Kang M. S.* (1979). Inhibition of lipid-linked saccharide synthesis: Comparison of tunicamycin, streptowirudin, and antibiotic 24010. Arch. Biochem. Biophys. 196, 311—318.
72. *Ely J. O., Tull F. A., Schanen J. M.* (1953). The effect of glucosamine on culture of embryo chicken heart cells. J. Franklin Inst. 255, 561—562.
73. *Engvall E., Ruoslahti E.* (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. Int. J. Cancer 20, 1—5.

74. *Ernster L., Sandri G., Hundall T., Carlsson G., Nordenbrand K.* (1977). Inhibitors as probes of mitochondrial adenosine triphosphatase. In «Structure and Function of Energy Transducing Membranes» (K. Van Dam and B. F. Van Gelder, eds.), pp. 209—222. Elsevier / North-Holland, Amsterdam.
75. *Evans W. H.* (1978). «Preparation and Characterization of Mammalian Plasma Membranes» (T. S. Work and E. Work, eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. North-Holland Publ., Amsterdam.
76. *Fidler I. J.* (1973). Selection of successive tumor lines for metastasis. Nature (London), New Biol. 242, 148—149.
77. *Fidler I. J.* (1975). Mechanisms of cancer invasion and metastasis. In «Cancer, a Comprehensive Treatise. Biology of Tumors: Surfaces, Immunology and Comparative Pathology» (F. F. Becker, ed.), Vol. 4, pp. 101—131. Plenum, New York.
78. *Fidler I. J., Gersten D. M., Budmen M. B.* (1976). Characterization in vivo and in vitro of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. Cancer Res. 36, 3160—3168.
79. *Fidler I. J., Kripke M. L.* (1977). Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. Science 197, 893—895.
80. *Fishman P. H., Brady R. O.* (1976). The altered metabolism of sialic acid-containing compounds in tumorigenic-virus-transformed cells. In «Biological Roles of Sialic Acid» (A. Rosenberg and C.-L. Schengrund, eds.), pp. 239 — 274. Plenum, New York.
81. *Fjelde A., Sorkin E., Rhodes J. M.* (1956). The effect of glucosamine on human epidermoid carcinoma cells in tissue culture. Exp. Cell Res. 10, 88—98.
82. *Fourcans B., Jain M. K.* (1974). Role of phospholipids in transport and enzymic reactions. Adv. Lipid Res. 12, 147—226.
83. *Fox C. F.* (1975). Phase transitions in model systems and membranes. In «Biochemistry of Cell Walls and Membranes» (H. L. Kornberg and D. C. Phillips, eds.), MTP International Review of Science, Biochemistry Series 1, Vol. 2, pp. 279—306. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
84. *Franke W. W., Kartenbeck J.* (1976). Some principles of membrane differentiation. In «Progress in Differentiation Research» (N. Muller-Berat et al., eds.), pp. 213—243. North-Holland Publ., Amsterdam.
85. *Freeman C. P., West D.* (1966). Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. J. Lipid Res. 7, 324—327.
86. *Friberg S., Jr.* (1972). Comparison of an immunoresistant and an immunosusceptible ascites subline from murine tumor TA3.1. Transplantability, morphology, and some physicochemical characteristics. J. Natl. Cancer Inst. 48, 1477—1489.
87. *Friberg S., Jr., Lilliehook B.* (1973). Evidence for non-exposed H-2 antigens in immunoresistant murine tumour. Nature (London), New Biol. 241, 112—113.
88. *Friedman S. J., Kimball T., Trotter C. D., Skehan P. J.* (1977). The inhibition of thymidine kinase in glial tumor cells by an amino sugar, D-glucosamine. Cancer Res. 37, 1068—1074.
89. *Friedman S. J., Trotter C. D., Kimball T., Skehan P. J.* (1977a). The inhibition of thymidine metabolism in tumor cells treated with D-glucosamine. Cancer Res. 37, 1141—1146.
90. *Friedman S. J., Skehan P. J.* (1978). Anesthetics inhibit sterol metabolism in glioma cells. J. Cell. Biol. 79, 240a.
91. *Friedman S. J., Skehan P. J.* (1978). Membrane effects of D-glucosamine. In Vitro 14, 336.
92. *Friedman S. J.* (1979). Anesthetics enhance tumor cell killing by D-glucosamine. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 187.
93. *Friedman S. J., Skehan P. J.* (1979). Anaesthetics inhibit sterol synthesis. Abstr., Int. Congr. Biochem., 11th, Toronto, p. 397.
94. *Friedman S. J., Skehan P. J.* (1979a). The inhibition of sterol synthesis by anesthetics. FEBS Lett. 102, 235—240.
95. *Friedman S. J., Skehan P. J.* (1980). Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 1172—1176.

96. *Frye L. D., Edidin M.* (1970). The rapid intermixing cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. J. Cell Sci. 7, 319—335.
97. *Fumagalli R., Grossi E., Paoletti P., Paoletti R.* (1964). Studies on lipids in brain tumors. I. Occurrence and significance of sterol precursors of cholesterol in human brain tumors. J. Neurochem. 11, 561—565.
98. *Furcht L. T., Mosher D. F., Wendelschafer-Crabb G.* (1978). Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts: light and electron microscopic studies. Cell 13, 263—271.
99. *Furcht L. T., Mosher D. F., Wendelschafer—Crabb G.* (1978). Effects of cell density and transformation on the formation of a fibronectin extracellular filamentous matrix on human fibroblasts. Cancer Res. 38, 4618—4623.
100. *Gahmberg C. G., Hakomori S.-I.* (1973). External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes. J. Biol. Chem. 248, 4311—4317.
101. *Gahmberg C. G., Kiehn D., Hakomori S.-I.* (1974). Changes in a surfacelabeled galactoprotein and in glycolipid concentrations in cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus mutant. Nature (London) 248, 413—415.
102. *Gahmberg C. G., Andersson L. C.* (1977). Selective radiolabeling of cell surface sialoglycoproteins by periodate-tritiated borohydride. J. Biol. Chem., 252, 5888—5894.
103. *Galla H. J., Sackmann E.* (1975). Chemically-induced lipid phase separation in model membranes containing charged lipids: A spin label study. Biochim. Biophys. Acta 401, 509—529.
104. *Gallimore P. H., McDougall J. K., Chen L. B.* (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. Cell 10, 669-678.
105. *Garber B.* (1963). Inhibition by glucosamine of aggregation of dissociated embryonic cells. Dev. Biol. 7, 630—641.
106. *Gasic G., Gasic T.* (1962). Removal and regeneration of the cell coating in tumour cells. Nature (London) 197, 170.
107. *Gazzotti P., Bock H. G., Fleischer S.* (1975). Interaction of beta-hydroxybutyrate apodehydrogenase with phospholipids. J. Biol. Chem. 250, 5782—5790.
108. *Ginsburg V.* (1978). Comparative biochemistry of nucleotide-linked sugars. Prog. Clin. Biol. Res. 23, 595—600.
109. *Glick M. C., Buck C. A.* (1973). Glycoproteins from the surface of metaphase cells. Biochemistry 12, 85—90.
110. *Glick M. C., Rabinowitz Z., Sachs L.* (1973). Surface membrane glycopeptides correlated with tumorigenesis. Biochemistry 12, 4864—4869.
111. *Glick M. C.* (1974). Chemical components of surface membranes related to biological properties. In «Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces» (E. Y. C. Lee and E. E. Smith, eds.), pp. 213—240. Academic Press, New York.
112. *Glick M. C., Flowers H.* (1978). Surface membranes. In «Glycoconjugates» (M. I. Horowitz and W. Pigman, eds.), Vol. 2, pp. 337—384. Academic Press, New York.
113. *Goldman S. S.* (1975). Cold resistance of the brain during hibernation. III. Evidence of a lipid adaptation. Am. J. Physiol. 228, 834—838.
114. *Goldstein I. J., Hayes C. E.* (1978). The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35, 128—340.
115. *Gottlieb C., Baenziger J., Kornfeld S.* (1975). Deficient uridine diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity in a clone of Chinese hamster ovary cells with altered surface glycoproteins. J. Biol. Chem., 250, 3303—3309.
116. *Grant C. W. M., McConnell H. M.* (1973). Fusion of phospholipid vesicles with viable Acholeplasma laidlawii. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 1238—1240.
117. *Grimes W. J.* (1970). Sialic acid transferase and sialic acid levels in normal and transformed cells. Biochemistry 9, 5083—5092.
118. *Grimes W. J.* (1973). Glucosyltransferase and sialic acid levels of normal and transformed cells. Biochemistry 12, 990—996.
119. *Guidotti G.* (1972). Membrane proteins. Annu. Rev. Biochem. 41, 731—752.

120. *Gurd J. W., Evans H. W.* (1976). Identification of liver plasma membrane glycoproteins which bind to^{125} I-labeled Concanavalin A following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Can. J. Biochem. 54, 477—480.
121. *Gurd J. W.* (1977). Synaptic plasma membrane glycoproteins: Molecular identification. Biochemistry 16, 369—374.
122. *Guy D., Latner A. L., Turner G. A.* (1979). Surface protein distributions in cells isolated from solid tumours and their metastases. Br. J. Cancer 40, 634—640.
123. *Harris H.* (1971). Cell fusion and the analysis of malignancy. The Croonian Lecture. Proc. R. Soc. London, Ser. B 179, 1—20.
124. *Hatanaka M.* (1974). Transport of sugars in tumor cell membranes. Biochim. Biophys. Acta 355, 77—104.
125. *Hazel J. R., Prosser D. L.* (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. Physiol. Rev. 54, 620—677.
126. *Helson L., Helson C., Sordillo P., Skehan P.* (1979). Inhibition of human neuroblastoma cells by D-glucosamine and papaverine. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 248.
127. *Hemming F. W.* (1974). Lipids in glycan biosynthesis. In «Biochemistry of Lipids» (H. L. Kornberg and D. C. Phillips, eds.), MTP International Review of Science, Biochem. Lipid Ser. 1, Vol. 4, pp. 39—97. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
128. *Hesketh T. R., Smith G. A., Houslay M. D., McGill K. A., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C., Warren G. B.* (1976). Annular lipids determine the ATPase activity of a Ca^{++} transport protein complexes with dipalmitoyllecithin. Biochemistry 15, 4145—4151.
129. *Hill T. L.* (1967). Electric fields and the cooperativity of biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 58, 111—114.
130. *Hogg N. M.* (1974). A comparison of membrane proteins of normal and transformed cells by lactoperoxidase labeling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 489—492.
131. *Houslay M. D., Hesketh T. R., Smith G. A., Warren G. B., Metcalfe J. C.* (1976). The lipid environment of the glucagon receptor regulates adenylate cyclase activity. Biochim. Biophys. Acta 436, 495—504.
132. *Howard S. P., Trenbeath T. P., Huggins J. W., Carraway K. L.* (1979). Occurrence of peanut lectin receptor (blood group T-antigen) in ascites but not solid and cultured forms of the 13762 rat mammary adenocarcinoma. J. Supramol. Struct., Suppl. 3, 212.
133. *Hubbell W. L., McConnell H. M.* (1971). Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. J. Am. Chem. Soc. 93, 314—326.
134. *Huggins J. W., Trenbeath T. P., Carraway K. L.* (1979). Redistribution and shedding of Concanavalin A and peanut lectin receptor of ascites sublines of the 13762 rat mammary adenocarcinoam. J. Supramol. Struct. Suppl. 3, 212.
135. *Hughes R. C.* (1976). «Membrane Glycoproteins.» Butterworth, London.
136. *Hughes R. C., Meager A., Nairn R.* (1977). Effect of 2-deoxyglucose on the cell surface glycoproteins of hamster fibroblasts. Eur. J. Biochem. 72, 265—273.
137. *Hynes R. O.* (1973). Alterations of cell surface proteins by viral transformation and by proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 3170—3174.
138. *Hynes R. O.* (1976). Cell surface proteins and malignant transformation. Biochim. Biophys. Acta 458, 73—107.
139. *Iwanaga S., Suzuki K., Hashimoto S.* (1978). Bovine plasma cold-insoluble globulin gross structure and function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 56—73.
140. *Jackson L. J., Seaman G. V. F.* (1972). Physicochemical properties of some glycopeptides released from human erythrocyte membranes by trypsin. Biochemistry 11, 44—49.
141. *Jacobson K., Papahadjopoulos D.* (1975). Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. Biochemistry 14, 152—162.
142. *Jaffe E. A., Mosher D. F.* (1978). Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 122—131.

143. *Jain M. K., White H. B.* (1977). Long-range order in biomembranes. Adv. Lipid Res. 15, 1—160.
144. *Jet' M., Jamieson G. A.* (1972). Secretory and surface components released by proteolysis of lymphoid cells and their isolated membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1225—1233.
145. *Jika R. L., Cavalieri R. L., Yaffe L., Pestka S.* (1977). Synthesis and glycosylation of the MOPC-46B immunoglobulin kappa chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 625—630.
146. *Jonasson J., Harris H.* (1977). The analysis of malignancy by cell fusion. VIII. Evidence for the intervention of an extra-chromosomal element. J. Cell Sci. 24, 255—263.
147. *Jonasson J., Povey S., Harris H.* (1977). The analysis of malignancy by cell fusion. VII. Cytogenetic analysis of hybrids between malignant and diploid cells and of tumours derived from them. J. Cell Sci. 24, 217—254.
148. *Jones P. A., Lang W. E., Gardner A., Nye C. A., Fink L. M., Benedict W. F.* (1976). In vitro correlates of transformation in C3H/10T clone 8 mouse cells. Cancer Res. 36, 2863—2867.
149. *Jost P. C., Griffith O. H., Capaldi R. A., Vanderkooi C.* (1973). Evidence for boundary lipid in membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 480—484.
150. *Juliano R. L., Behar-Bannelier M.* (1975). Surface polypeptides of the cultured Chinese hamster ovary cell. Biochemistry 14, 3816—3825.
151. *Juliano R. L., Behar-Bannelier M.* (1975). An evaluation of techniques for labeling the surface proteins of cultured mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta 375, 249—267.
152. *Juliano R. L., Ling V.* (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta 455, 152—162.
153. *Juliano R., Ling V., Graves J.* (1976). Drug-resistant mutants of Chinese hamster ovary cells possess an altered cell surface carbohydrate component. J. Supramol. Struct. 4, 521—526.
154. *Juliano R. L.* (1978). Techniques for the analysis of membrane glycoproteins. Curr. Top. Membr. Transp. 11, 107—144.
155. *Juliano R. L.* (1978). Adhesion and detachment characteristics of Chinese hamster cell membrane variants. J. Cell Biol. 76, 43—49.
156. *Jung C. Y.* (1974). Inactivation of glucose carriers in human erythrocyte membranes by I-fluoro-2,4-dinitrobenzene. J. Biol. Chem. 249, 3568—3573.
157. *Junge W.* (1972). Brownian rotation of the cytochrome oxidase in the mitochondrial inner membranes. FEBS Lett. 25, 109—112.
158. *Junge W., Eckhoff A.* (1973). On the orientation of chlorophyll-a in the functional membrane of photosynthesis. FEBS Lett. 36, 207—212.
159. *Kahn P., Shin S.-I.* (1979). Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of association among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independense, and tumorforming ability. J. Cell Biol. 82, 1—16.
160. *Kaluza G., Schmidt M. F. G., Scholtissek C.* (1973). Effect of 2-deoxyglucose on the multiplicity of Semliki Forest Virus and the reversal of the block by mannose. Virology 54, 179—189.
161. *Kang S., Gutowsky H. S., Hshung J. C., Jacobs R., King R. E., Rice D., Oldfield E.* (1979). Nuclear magnetic resonance investigation of the cytochrome oxidase-phospholipid interaction: A new model for boundary lipid. Biochemistry 18, 3257—3267.
162. *Kaplan A., Achold D. T., Sly W. S.* (1977). Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 2026—2030.
163. *Karnovsky M. J., Unanue E. R.* (1973). Mapping and migration of lymphocyte surface macromolecules. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 55—59.
164. *Kawai S., Hanafusa H.* (1971). The effects of reciprocal changes in temperature on the transformed state of cell infected by Rous sarcoma virus mutant. Virology, 46, 470—479.
165. *Keiser L. W., Capizzi R. L.* (1977). Principles of combination chemotherapy. In «Cancer, A Comprehensive Treatise» (F. F. Becker, ed.), Vol. 5, pp. 163—190. Plenum, New York.

166. *Kent P. W., Mora P. T.* (1973). Biochemically-induced modifications of the structure of membrane-bound oligosaccharides. In «Membrane-Mediated Information» (P. W. Kent. ed.), Vol. 1, pp. 129—141. MTP Med. Tech. Publ., Lancaster, England.
167. *Keski-Oja J., Vaheri A., Ruoslahti E.* (1976). Fibroblast surface antigen (SF): The external glycoprotein lost in proteolytic stimulation and malignant transformation. Int. J. Cancer 17, 261—269.
168. *Kimelberg H. K.* (1977). The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. In «Dynamic Aspects of Cell Surface Organization» (G. Poste and G. L. Nicolson, eds.), pp. 205—293. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
169. *Klebe R. J.* (1974). Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. Nature (London) 250, 248—251.
170. *Klein G., Friberg S., Wiener F., Harris H.* (1973). Studies on hybrid cells derived from the fusion of the TA3/Ha ascites carcinoma with normal fibroblasts. 1. Malignancy, karyotype, and formation of isoantigenic variants. J. Natl. Cancer Inst. 50, 1259—1268.
171. *Kornberg R. D., McConnell H. M.* (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. Biochemistry 10, 1111—1120.
172. *Kornfeld S., Kornfeld R.* (1978). Use of lectins in the study of mammalian glycoproteins. In «The Glycoconjugates» (M. I. Horowitz and W. Pigman, eds.), Vol. 2, pp. 437—449. Academic Press, New York.
173. *Kronquist K. E., Lennarz W. J.* (1978). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins by lipid-linked saccharides: A study of potential exogenous acceptor proteins. J. Supramol. Struct. 8, 51—65.
174. *Krupka R. M.* (1971). Evidence for a carrier conformational change associated with sugar transport in erythrocytes. Biochemistry 10, 1143—1148.
175. *Kuroda Y.* (1974). Effects of hexosamines and their acetyl derivatives on aggregation of rat hepatoma cells in rotation culture. Cancer Res. 34, 403—409.
176. *Kuusela P., Ruoslahti E., Vaheri A.* (1975). Polypeptides of glycoprotein antigen (SF) present in serum and surface of normal but not to transformed chicken fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 379, 295—303.
177. *Ladbrooke B. D., Williams R. M., Chapman D.* (1968). Studies on lecithin-cholesterol-waterinteractions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. Biochim. Biophys. Acta 150, 333—340.
178. *Laemmli U. K.* (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (London) 256, 495—497.
179. *Lage-Davila A., Krust B., Hofmann-Clerc F., Torpier G., Montagnier L.* (1979). BUdR — induced reversion of transformed characteristics in BHK 21 cells: Changes at the plasma membrane level. J. Cell. Physiol. 100, 95—108.
180. *Laird A. K.* (1969). Dynamics of growth in tumors and in normal organisms. Natl. Cancer Inst. Monogr. 30, 15—28.
181. *Lee A. G.* (1977). Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids. Biochim. Biophys. Acta 472, 285—344.
182. *Lenard J., Singer S. J.* (1966). Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 56, 1828—1835.
183. *Lenard J., Rothman J. E.* (1976). Transbilayer distribution and movement of cholesterol and phospholipid in the membrane of influenza virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 391—395.
184. *Lin E. S., Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H.* (1977). Transformation by simian virus 40 induces virus-specific related antigens in the surface membrane and nuclear envelope. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 2495—2499.
185. *Linden C. D., Wright K. L., McConnell H. M., Fox C. F.* (1973). Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 2271—2275.
186. *Linder E., Vaheri A., Ruoslahti E., Wartiovaara J.* (1975). Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. J. Exp. Med. 142, 41—49.
187. *Linder E., Stenman S., Lehto V.-P., Vaheri A.* (1978). Distribution of fib-

ronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312. 151—159.
188. *Lindner J., Schweinitz H. A., Becker K.* (1960). Über die geschwushtemmende Wirkung von Grundsubstanzbesyandteilen II. Mitteilung Stoffwechseluntersuchungen. Klin. Wochenschr. 38. 763—768.
189. *Lis H., Sharon N.* (1973). The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Annu. Rev. Biochem. 42, 541—574.
190. *Lloyd C. W., Kemp R. B.* (1971). A biochemical investigation into the inhibitory effects of glucosamine and N-acetylglucosamine on the aggregation in vitro of empryonic chick muscle cells. J. Cell. Sci. 9, 85—101.
191. *Lorer H. C.* (1975). Effect of D-glucosamine and D-galactosamine on the uridine nucleotide concentration in mouse myeloid tumor (Graffi) and myeloma MOPC—21. Neoplasma. 22, 23—27.
192. *Maggio B., Cumar F. A.* (1978). Surface behavior of glycosphingolipids and its relevance to the metabolic changes of gangliosides in transformed cells. In «Advances in Medical Oncology. Research and Education» (M. Fox. ad.). Vol. 4, pp. 141—148. Pergamon. Oxford.
193. *Makita A., Seyama Y.* (1971). Alterations of Forssman-antigenic reactivity and of monosaccharide composition in plasma membrane from polyoma-transformed hamster cells. Biochim. Biophys. Acta 241, 403—411.
194. *Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L., Segrest J. P., Scott R. E.* (1972). Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1445—1449.
195. *Marciani D. J., Lyons L. B., Thompson E. B.* (1976). Characteristics of cell membranes from somatic cell hybrids between rat hepatoma and mouse L-cells. Cancer Res. 36, 2937—2944.
196. *Marshall R. D.* (1974). The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. Biochem. Soc. Symp. 40, 17—26.
197. *Marshall R. D.* (1979). Some observations on why many proteins are glycosylated. Trans. Biochem. Soc. 7, 660—665.
198. *Martin G. S.* (1971). Mutants of the Schmidt-Ruppin strain of Rous sarcoma virus. In «The Biology of Oncogenic Viruses» (L. Silvestri, ed.), pp. 320—335. North-Holland Publ., Amsterdam.
199. *Mautner V., Hynes R. O.* (1977). Surface distribution of LETS protein in relation to the cytoskeleton normal and transformed cells. J. Cell Biol. 15, 743—768.
200. *McCormick P. J., Keys B. J., Pucci C., Millis A. J. T.* (1979). Human fibroblast conditioned medium contains a 100K dalton glucose-regulated cell surface protein. Cell. 18, 173—182.
201. *McNamee M. G., McConnell H. M.* (1973). Transmembrane potentials and phospholipid flip-flop in excitable membrane vesicles. Biochemistry 12, 2951—2958.
202. *Meager A., Ungkitchanukit A., Nairn R., Hughes R. C.* (1975). Ricin resistance in baby hamster kidney cells. Nature (London) 257, 137—139.
203. *Meager A., Nairn R., Hughes R. C., Garrett A. J., Reeson D. E.* (1978). Tumorigenicity of adenovirus-5-transformed BHK cell lines with various transformation associated properties. Br. J. Cancer 37, 566—570.
204. *Metcalfe J. C., Warren G. B.* (1977). Lipid-protein interactions in a reconstituted calcium pump. In «International Cell Biology, 1976—1977» (B. R. Brinkley and K. R. Porter, eds.), pp. 15—23. Rockefeller Univ. Press. New York.
205. *Miller D. K., Cooper A. G., Brown M. C., Jeanloz R. W.* (1975). Reversible loss in suspension culture of a major cell-surface glycoprotein of the TA3-Ha mouse tumor. J. Natl. Cancer Inst. 55, 1249—1252.
206. *Miller S. C., Hay E. D., Codington J. F.* (1977). Ultrastructural and biochemical differences in cell surface properties of strain-specific and nonstrain-specific TA3 adenocarcinoma cells. Cell Biol. 72, 511—529.
207. *Mills J. R., Adamany A. M.* (1978). Impairment of dolichol saccharide synthesis and dolichol-mediated glycoprotein assembly in the aortic smooth muscle cell in culture by inhibitors of cholesterol biosynthesis. J. Biol. Chem. 253, 5270—5273.

208. *Molnar Z., Bekesi J. G.* (1972). Cytotoxic effects of D-glucosamine on the ultrastructure of normal and neoplastic tissues in vivo. Cancer Res. 32, 756—765.
209. *Molnar Z., Bekesi J. G.* (1972a). Effects of D-glucosamine, D-mannosamine and 2-deoxyglucose on the ultrastructure of ascites tumor cells in vitro. Cancer Res. 32, 380—389.
210. *Morre D. J., Kartenback J., Franke W.* (1979). Membrane flow and interconversions among endomembranes. Biochim. Biophys. Acta 559, 71—152.
211. *Morrison D. C., Morowitz H. F.* (1970). Studies on membrane synthesis in Bacillus megaterium KM. J. Mol. Biol. 49, 441—459.
212. *Morrison P. R., Edsall J. T., Miller S. G.* (1948). Preparation and properties of serum and plasma proteins. XVIII./Separation of purified fibrinogen from fraction of human plasma. J. Am. Chem. Soc. 70, 3103—3108.
213. *Mosesson M. W., Chen A. R., Huseby R. M.* (1975). The cold-insoluble globulin of human plasma: Studies of its essential structural features. Biochim. Biophys. Acta 386, 509—524.
214. *Mosesson M. W.* (1978). Structure of human plasma cold-insoluble globulin and the mechanism of its precipitation in the cold with heparin or fibrin-fibrinogen complexes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 11—30.
215. *Mosher D. F.* (1975). Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. J. Biol. Chem. 250, 6614—6621.
216. *Mosher D. F.* (1977). Labeling of a major fibroblast surface protein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIIa. Biochim. Biophys. Acta 491. 205—210.
217. *Mosher D. F.* (1978). Cross-linking of plasma and cellular fibronectin by plasma transglutaminase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 38—42.
218. *Mosher D. F., Vaheri A.* (1978). Thrombin stimulates the production and release of a major surface-associated glycoprotein (fibronectin) in cultures of human fibroblasts. Exp. Cell. Res. 112, 323—334.
219. *Myers-Robfogel M. W., Canellakis Z. N., Bono V. H., Jr., Dion R L.* (1979). Cunning-2-deoxy-D-glucose. Biochem. Pharmacol. 28, 1953—1957.
220. *Narasimhan S., Stanley P., Schachter H.* (1977). Control of glycoprotein synthesis. Lectin-resistant mutant containing only one of two distinct N-acetylglucosaminyl-transferase activities present in wild-type Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 252, 3926—3933.
221. *Neufeld E. F., Sando G. N., Garvin A. J., Rome L. H.* (1977). The transport of lysosomal enzymes. J. Supramol. Struct. 6, 95—101.
222. *Nicolson G. L., Winkelhake J. L.* (1975). Organ specificity of blood-borne tumor metastasis determined by cell adhesion. Nature (London) 255, 230—232.
223. *Nicolson G. L.* (1976). Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. Biochim. Biophys. Acta 457, 57—108.
224. *Nicolson G. L.* (1976). Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. Biochim. Biophys. Acta 458, 1—72.
225. *Nicolson G. L., Birdwell C. R., Brunson K. W., Robbins J. C., Beattie G., Fidler I. J.* (1977). Cell interactions in the metastatic process: Some cell surface properties associated with successful blood-borne tumor spread. In «Cell and Tissue Interactions» (J. W. Lash and M. M. Burger, eds.), pp. 225—241, Raven, New York.
226. *Nicolson G. L., Poste G., Ji T. H.* (1977). The dynamics of cell membrane organization. In «Dynamic Aspects of Cell Surface Organization» (G. Poste and G. L. Nicolson, eds.), pp. 1—73, North-Holland Publ., Amsterdam.
227. *Nicolson G. L., Brunson K. W., Fidler I. J.* (1978). Specificity of arrest, survival and growth of selected metastatic variant cell lines. Cancer Res. 38, 4105—4111.
228. *O'Farrell P. H.* (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007—4021.
229. *Ogata S., Muramatsu T., Kobata A.* (1976). New structural characteristic of the large glycopeptides from transformed cells. Nature (London) 259, 580—582.

230. *Ohnishi S., Ito T.* (1973). Clustering of lecithin molecules in phosphatidylserine membranes induced by calcium ion binding to phosphatidylserine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 132—138.
231. *Olden K., Pratt R. M., Yamada K. M.* (1978). Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: Effects of tunicamycin on the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts. Cell 13, 461—473.
232. *Olden K., Pratt R. M., Yamada K. M.* (1979). Selective cytotoxicity of tunicamycin for transformed cells. Int. J. Cancer 24, 60—66.
233. *Olden K., Pratt R. M., Jaworski C., Yamada K. M.* (1979). Evidence for role of glycoprotein carbohydrates in membrane transport: Specific inhibition by tunicamycin. Proc. Natl. Sci. U. S. A. 76, 791—795.
234. *Oldfield E., Chapman D.* (1972). Dynamics of lipids in membranes: Heterogeneity and the role of cholesterol. FEBS Lett. 23, 285—297.
235. *Papahadjopoulos D., Cowden M., Kimelberg H. K.* (1973). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. Biochim. Biophys. Acta 330, 8—26.
236. *Papahadjopoulos D., Jacobson K., Nitr S., Isac T.* (1973a). Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 311, 330—348.
237. *Papahadjopoulos D.* (1974). Cholesterol and cell membrane function. A hypothesis concerning the etiology of atherosclerosis. J. Theor. Biol. 43, 329—337.
238. *Papahadjopoulos D., Poste D.* (1975). Calcium-induced phase separation and fusion in phospholipid membranes. Biophys. J. 15, 945—948.
239. *Papahadjopoulos D., Jacobson K., Poste G., Shepherd G.* (1975). Effects of local anesthetics on membrane properties. I. Changes in the fluidity of phospholipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta 394, 504—519.
240. *Papahadjopoulos D., Moscarello M., Eylar E. H., Isac T.* (1975a). Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. Biochim. Biophys. Acta 401, 317—355.
241. *Pardee A. B.* (1975). The cell surface and fibroblast proliferation: Some current research trends. Biochim. Biophys. Acta 417, 153—172.
242. *Parsons R. B., Todd H. D., Kowal R.* (1979). Identification of a fibronectin-derived human serum tumor marker. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 27.
243. *Pearlstein E., Waterfield M. D.* (1974). Metabolic studies on ^{125} I-labeled baby hamster kidney cell plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta 362, 1—12.
244. *Pearlstein E., Hynes R. O., Franks L. M., Hemmings V. J.* (1976). Surface proteins and fibrinolytic activity of cultured mammalian cells. Cancer Res. 36, 1475—1480.
245. *Pearlstein E.* (1977). Isolation and characterization of plasma membrane glycoproteins from normal and transformed mammalian cells employing lectin affinity chromatography. Exp. Cell Res. 109, 95—103.
246. *Peters R., Peters J., Tews K. H., Bahr W.* (1974). A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. Biochim. Biophys. Acta 367, 282—294.
247. *Philippot J. R., Cooper A. G., Wallach D. F. H.* (1977). Regulation of cholesterol biosynthesis by normal and leukemic (L_2C) guinea pig lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 956—960.
248. *Phillips M. C., Hauser H., Paltauf F.* (1972). The inter- and intra-molecular mixing of hydrocarbon chains in lecithin/water systems. Chem. Phys. Lipids 8, 127—133.
249. *Phillips M. C., Finer E. G.* (1974). The stoichiometry and dynamics of lecithin cholesterol clusters in bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 356, 199—206.
250. *Plagemann P. G. W., Erbe J.* (1973). Transport and metabolism of D-glucosamine by cultured Novikoff rat hepatoma cells and effects on nucleotide pool. Cancer Res. 33, 482—492.
251. *Poo M. M., Cone R. A.* (1974). Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. Nature (London) 247, 438—441.

252. *Pouyssegur J. M., Pastan I.* (1976). Mutants of BALB/c 3T3 fibroblasts defective in adhesiveness to substratum: Evidence for alteration in cell surface proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 544—548.
253. *Pouyssegur J., Willingham M., Pastan I.* (1977). Role of cell surface carbohydrates and proteins in cell behavior: Studies on the biochemical reservion of an N-acetyl-glucosamine-deficient fibroblast mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 243—247.
254. *Pouyssegur J., Yamada K. M.* (1978). Isolation and immunological characterization of a glucose-regulated fibroblast cell surface glycoprotein and its nonglycosylated precursor. Cell 13, 139—150.
255. *Price M. R., Stoddart R. W.* (1976). A characteristic protein of the surfaces of neoplastic cells. Biochem. Soc. Trans. 4, 673—675.
256. *Quastel J. H., Cantero A.* (1953). Inhibition of tumor growth by D-glucosamine. Nature (London) 171, 252—254.
257. *Quinn P. J.* (1976). «The Molecular Biology of Cell Membranes.» Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
258. *Raff M. C., DePetris S.* (1973). Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: The fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 48—54.
259. *Raison J. K.* (1973). The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. Bioenergetics 4, 285—309.
260. *Razi-Naqvi K., Gonzales-Rodriguez J., Cherry R. J., Chapman D.* (1973). Spectroscopic technique for studying protein rotation in membranes. Nature (London) New Biol. 245, 249—251.
261. *Rieber M., Bacalao J., Alonso G.* (1975). Turnover of high-molecular-weight cell surface protein during growth and expression of malignant transformation. Cancer Res. 35, 2104—2108.
262. *Rieber M., Rieber M. S.* (1979). Heterogeneity in cell-associated transformation-sensitive proteins antigenically related to fibronectin. Cancer Res. 39, 1803—1806.
263. *Riordan J. R. and Ling V.* (1979). Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. J. Biol. Chem. 254, 12701—12705.
264. *Robbins P. W., Hubbard S. C., Turco S. J., Wirth D. F.* (1977). Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins. Cell 12, 893—900.
265. *Robinson P. J., Bull F. G., Anderton B. H., Roitt I. M.* (1975). Direct autoradiographic visualization in SDS-gels of lectin-binding components of the human erythrocyte membrane. FEBS Lett. 58, 330—333.
266. *Roelofsen B., van Deenan L. L. M.* (1973). Lipid requirement of membrane bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts. Eur. J. Biochem. 40, 245—257.
267. *Roper P. R., Drewinko B.* (1976). Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. Cancer Res. 36, 2181—2188.
268. *Rothman J. E., Lenard J.* (1977). Membrane asymmetry. Science 195, 743—753.
269. *Rubin A., Springer G. F., Hogue M. J.* (1954). The effect of D-glucosamine HCl and related compounds on tissue cultures of the solid form of mouse Sarcoma 37. Cancer Res. 14, 456—458.
270. *Ruoslahti E., Vaheri A., Kuusela P., Linder E.* (1973). Fibroblast surface antigen: A new serum protein. Biochim. Biophys. Acta 322, 352—358.
271. *Ruoslahti E., Vaheri A.* (1974). Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane. Nature (London) 248, 789—791.
272. *Ruoslahti E., Vaheri A.* (1975). Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. J. Exp. Med. 141, 497—501.
273. *Ruoslahti E., Engvaal E.* (1978). Immunochemical and collagen-binding properties fibronectin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 178—191.
274. *Sabine J. R.* (1977). «Cholesterol.» Dekker, New York.
275. *Sager R., Kovac P. E.* (1978). Genetic analysis of tumorigenesis: 1. Expression

of tumor-forming ability in hamster hybrid cell lines. Somat. Cell Genet. 4, 375—392.
276. *Sanford B. H., Codington J. F., Jeanloz R. W., Palmer P. D.* (1973). Transplantability and antigenicity of two sublines of the TA3 tumor. J. Immunol. 110, 1233—1237.
277. *Sartorelli A. C., Johns D. G., eds.* (1975). «Antineoplastic and Immunosupressive Agents,» Part II. Springer-Verlag, Berlin and New York.
278. *Schachter H.* (1978). Glycoprotein biosynthesis. In «The Glycoconjugates» (M. I. Horowitz and W. Pigman, eds.), Vol. 2, pp. 87—181. Academic Press, New York.
279. *Schmidt-Ullrich R., Verma S. P., Wallach D. F. H.* (1975). Anomalous side chain amidation in plasma membrane proteins of simian virus 40-transformed lymphocytes indicated by isoelectric focussing and laser-Raman spectroscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1062—1069.
280. *Schmidt-Ullrich R., Thompson W. A., Wallach D. F. H.* (1977). Antigenic distinctions of glycoproteins in plasma and mitochondrial membranes of lymphoid cells neoplastically-transformed by SV40. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 643—647.
281. *Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H.* (1978). Membrane proteins of cells neoplastically transformed by simian virus 40. Prog. Exp. Tumor Res. 22, 151—189.
282. *Scholtissek C.* (1972). Influence of glucosamine on the uptake of nucleosides by chick fibroblasts and on the incorporation into RNA. Biochim. Biophys. Acta 277, 459—465.
283. *Scholtissek C.* (1975). Inhibition of the multiplication of enveloped viruses by glucose derivatives, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 70, 101—119.
284. *Scholtissek C., Rott R., Klenk H. D.* (1975). Two different mechanisms of the inhibition of the multiplication of enveloped viruses by glucosamine. Virology 63, 191—200.
285. *Schwarz R. T., Schmidt M. F. G., Datema R.* (1979). Inhibition of glycosylation of viral glycoproteins. Trans. Biochem. Soc. 7, 322—325.
286. *Seelig J., Niederberger W.* (1974). Two pictures of a lipid bilayer. A comparison between deuterium label and spin-label experiments. Biochemistry 13, 1585—1588.
287. *Shin B. C., Ebner K. E., Hudson B. G., Carraway K. L.* (1975). Membrane glycoprotein differences between normal lactating mammary tissue and the R3230 AC mammary tumor. Cancer Res. 35, 1135—1140.
288. *Shiu R. P. C., Pouyssegur J., Pastan I.* (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 3840—3844.
289. *Simpson-Herren L., Lloyd H. H.* (1970). Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems. Cancer Chemother. Rep., Part I 54, 143—174.
290. *Singer S. J., Nicolson G. L.* (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720—731.
291. *Sinha B. K., Goldenberg G. J.* (1974). The effect of trypsin and neuraminidase on the circulation and organ distribution of tumor cells. Cancer (Philadelphia) 34, 1956—1961.
292. *Skeel R. T., Lindquist C. A.* (1977). Clinical aspects of resistance to antineoplastic agents. In «Cancer, a Comprehensive Treatise» (F. F. Becker, ed.), Vol. 5, pp. 113—143. Plenum, New York.
293. *Skehan P.* (1976). On the regulation of cell growth in culture. Exp. Cell Res. 97, 184—192.
294. *Skehan P., Friedman S. J.* (1979). Cellular senescence and the analysis of generation time distributions. Cell. Biol. Int. Rep. 3, 535—542.
295. *Skehan P., Friedman S. J.* (1979a). Non-exponential patterns of mammalian cell growth. J. Cell Biol. 83, 3a.
296. *Skehan P., Friedman S. J.* (1980). Mammalian cell growth in culture is non-exponential. In preparation.
297. *Slayter H. S., Codington J. F.* (1973). Size and configuration of glycoprotein

fragments cleaved from tumor cells by proteolysis. J. Biol. Chem. 248, 3405—3410.
298. *Smets L. A., Van Beek W. P., Van Rooij H.* (1976). Surface glycoproteins and Concanavalin A-mediated agglutinability of clonal variants and tumor cells derived from SV40 virus-transformed mouse 3T3 cells. Int. J. Cancer 18, 462—468.
299. *Smith R. J. M., Green C.* (1974). The rate of cholesterol flip-flop in lipid bilayers and its relation to membrane sterol pools. FEBS Lett. 42, 108—111.
300. *Spiro R. G.* (1973). Glycoproteins. Adv. Protein Chem. 27, 349—467.
301. *Springer G. F., Codington J. F., Jeanloz R. W.* (1972). Surface glycoprotein from a mouse tumor cell as specific inhibitor of antihuman blood-group N agglutinin. J. Natl. Cancer Inst. 49, 1469—1470.
302. *Stanley P., Caillibot V., Simonovitch L.* (1975). Stable alterations at the cell membrane of Chinese hamster ovary cells resistant to the cytotoxicity of phytohemagglutinin. Somat. Cell Genet. 1, 3—26.
303. *Stanley P., Narasimhan S., Simonovitch L., Sachachter H.* (1975a). Chinese hamster ovary cells selected for resistance to the cytotoxicity of phytohemagglutinin are deficient in a UDP-N-acetylglucosamine-glycoprotein N-acetylglucosaminyl-transferase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3323—3327.
304. *Stanley P., Simonovitch L.* (1977). Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. Somat. Cell Genet. 3, 391—405.
305. *Steck T. L.* (1974). The organization of proteins in the human red blood cell membrane. J. Cell Biol. 62, 1—19.
306. *Steck T. L., Dawson G.* (1974). Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem., 249, 2135—2142.
307. *Steel G.* (1977). «Growth Kinetics of Tumours.» Oxford Univ. Press (Clarendon), London and New York.
308. *Steiner S., Courtney R. J., Melnick J. L.* (1973). Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into glycoproteins of normal and simian virus 40-transformed hamster cells. Cancer Res. 33, 2402—2407.
309. *Steiner S., Steiner M. R.* (1973). Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into glycolipids of normal and SV40-transformed hamster cells. Biochim. Biophys. Acta 296, 403—410.
310. *Stenman S., Vaheri A.* (1978). Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. J. Exp. Med. 147, 1054—1064.
311. *Stoddart R. W.* (1979). Nuclear glycoconjugates and their relation to malignancy. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 54, 199—235.
312. *Stone K. R., Smith R. E., Joklik W. K.* (1974). Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblasts and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses. Virology 58, 86—100.
313. *Stringfellow D. A., Fitzpatrick F. A.* (1979). Prostaglandin D_2 controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells. Nature (London) 282, 76—78.
314. *Struck D. L., Lennarz W. G.* (1977). Evidence for the participation of saccharide lipids in the synthesis of the oligosaccharide chain of ovalbumin. J. Biol. Chem. 252, 1007—1013.
315. *Sukeno T., Kikuchi H., Saeki H., Tsuiki S.* (1971). Transformation of glycosamine to glycogen and lactate by ascites tumor cells. Biochim. Biophys. Acta 244, 19—29.
316. *Tabas I., Schlesinger S., Kornfeld S.* (1978). Processing of high mannose oligosaccharides to form complex type oligosaccharides on the newly synthesized polypeptides of the vesicular stomatitis virus G protein and the IgG heavy chain J. Biol. Chem. 253, 716—722.
317. *Takasuki A., Kohno K., Tamura K.* (1975). Inhibition of biosynthesis of polyisoprenol sugars in chick embryo microsomes by tunicamycin. Agric. Biol. Chem. 39, 2089—2091.
318. *Takasuki A., Nishimura M., Kohno K., Onodera K., Tamura G.* (1976). Abstr. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Jpn. p. 131. Cited in Duksin and Bornstein (67).
319. *Talmadge J. E., Starkey J. R., Davis W. C.* (1979). Characterization of induced

metastatic variants from a cloned metastatically homogeneous cell line. J. Supramol. Struct. Suppl. 3, 183.
320. *Tanner M. J. A., Anstee D. J.* (1975). A method for the direct demonstration of the lectin-binding components of the human erythrocyte membrane. Biochem. J. 153, 265—270.
321. *Taylor R. B., Duffus W. P. H., Raff M. C., DePetris S.* (1971). Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by antiimmunoglobulin antibody. Nature (London), New Biol. 233, 225—229.
322. *Tesoriere G., Vento R., Calvaruso G.* (1975). Inhibitory effect of D-glucosamine on glycolysis in bovine retina. Biochim. Biophys. Acta 385, 58—67.
323. *Tkacz J. S., Lampen J. O.* (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenol N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 248—257.
324. *Trauble H., Sackmann E.* (1972). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. III. Structure of a steroid-lecithin system below and above the lipid-phase transition. J. Amer. Chem. Soc. 94, 4499—4510.
325. *Trauble H., Eibl H.* (1974). Electrostatic effects on lipid phase transitions: Membrane structure and ionic environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 214—219.
326. *Trauble H., Metcalfe J.* (1975). Molecular interactions in lipid bilayers. In «Functional Linkage In Biomolecular Systems» (F. O. Schmitt, D. M. Schneider, and D. M. Crothers, eds.), pp. 59—101. Raven, New York.
327. *Turco S. J., Stetson B., Robbins P. W.* (1977). Comparative rates of transfer of lipid-linked oligosaccharides to endogenous glycoprotein acceptors in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4411—4414.
328. *Uhlenbruck G., Dahr W.* (1971). Studies on lectins with a broad agglutination spectrum. XII. N-acetyl-D-galactosamine specific lectins from the seeds of Soja hispida, Bauhinia purpura, Iberis amara, Moluccella laevis, and Vicia graminea. Vox Sang. 21, 338—351.
329. *Vaheri A., Ruoslahti E.* (1974). Disappearance of a major cell-type specific surface glycoprotein antigen (SF) after transformation of fibroblasts by Rous sarcoma virus. Int. J. Cancer 13, 579—586.
330. *Vaheri A., Ruoslahti E.* (1975). Fibroblast surface antigen produced but not retained by virus-transformed human cells. J. Exp. Med. 142, 530—535.
331. *Vaheri A., Ruoslahti E., Westermark B., Ponten J.* (1976). A common cell-type specific surface antigen (SF) in cultured human glial cells and fibroblasts: Loss in malignant cells. J. Exp. Med. 143, 64—72.
332. *Van Beek W. P., Smets L. A., Emmelot P.* (1973). Increase sialic acid density in surface glycoprotein of transformed and malignant cells.— A general phenomenon? Cancer Res. 33, 2913—2922.
333. *Van Beek W. P., Smets L. A., Emmelot P.* (1975). Changed surface glycoprotein as a marker of malignancy in human leukaemic cells. Nature (London) 253, 457—460.
334. *Verma S. P., Schmidt-Ullrich R., Thompson W. S., Wallach D. F. H.* (1977). Differences between the structural dynamics of plasma membranes of normal hamster lymphocytes and lymphoid cells neoplastically transformed by simian virus 40 as revealed by laser Raman spectroscopy. Cancer Res 37, 3490—3493.
335. *Waechter C. J., Lennarz W. J.* (1976). The role of polyprenol linked sugars in glycoprotein synthesis. Annu. Rev. Biochem. 45, 95—112.
336. *Walborg E. F., Jr.* (1978). Current concepts of glycoprotein structure. In «Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes» (E. F. Wahlborg, Jr., ed.), Symposium Series, No. 80, pp. 5—20. Am. Chem. Soc., Washington, D. C.
337. *Wallach D. F. H., Zahler P.* (1966). Protein conformations in cellular membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 56, 1552—1559.
338. *Wallach D. F. H.* (1975) «Membrane Molecular Biology of Neoplastic Cells.» Elsevier, Amsterdam.
339. *Wallach D. F. H., Biert V., Verma S. P., Schmidt-Ullrich R.* (1975). Lipid-lipid and lipid-protein interaction in model systems and membranes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 264, 142—160.

340. *Wallach D. F. H.* (1976). Membrane anomalies of neoplastic cells. Med. Hypotheses 2, 241—256.
341. *Wallach D. F. H.* (1977). Cooperative state transitions in biomembranes: Spectroscopic analyses. In «Structural and Kinetic Approach to Plasma Membrane Functions» (C. Nicolau and A. Paraf. eds.), pp. 1—28. Springer-Verlag, Berlin and New York.
342. *Wallach* D. F. H., *Verma S. P., Fookson J.* (1979). Application of laser Raman and infrared spectroscopy to the analysis of membrane structure. Biochem. Biophys. Acta 559, 153—208.
343. *Walsh F. S., Crumpton M. J.* (1977). Orientation of cell-surface antigens in the lipid bilayer of lymphocyte plasma membranes. Nature (London) 269, 307—311.
344. *Warren L., Fuhrer J. P., Buck C. A.* (1972). Surface glycoproteins of normal and transformed cells: A difference determined by sialic acid and growth-dependent sialytransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1838—1842.
345. *Warren L., Zeidman I., Buck C. A.* (1975). The surface glycoproteins of mouse melanoma growing in culture and as a solid tumor in vivo. Cancer Res. 35, 2186-2190.
346. *Warren L., Buck C. A., Tuszynski G. P., Fuhrer J. P.* (1977). The membrane glycoproteins of normal and malignant cells. In «International Cell Biology, 1976—1977» (B. R. Brinkley and K. R. Porter, eds.), pp. 149—158. Rockefeller Univ. Press, New York.
347. *Warren L., Buck C. A., Tuszynski G. P.* (1979). Glycopeptide changes and malignant transformation: A possible role for carbohydrate in malignant behavior. Biochim. Biophys. Acta 516, 97—127.
348. *Wartiovaara J., Leiva I., Virtanen I., Vaheri A.* (1978). Cell surface and extracellular matrix glycoprotein fibronectin: Expression in embryogenesis and in teratocarcinoma differentiation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 312, 132—141.
349. *Watkins J. F., Grace D. M.* (1967). Studies on the surface antigens of interspecific mammalian cell hterokaryons. J. Cell Sci. 2, 193—204.
350. *Weiss L.* (1967). «The Cell Periphery, Metastasis and Other Contact Phenomena.» North-Holland Publ., Amsterdam.
351. *Weiss L.* (1973). Neuraminidase, sialic acids and cell interactions. J. Natl. Cancer Inst. 50, 3—19.
352. *Weiss L., Glaves D., Waite D. A.* (1974). The influence of host immunity on the arrest of circulating cancer cells and its modification by neuraminidase. Int. J. Cancer 13, 850—862.
353. *Weiss L.* (1977). A pathobiologic overview of metastasis. Semin. Oncol. 4, 5—17.
354. *Wiener F., Klein G., Harris H.* (1971). The analysis of malignancy by cell fusion. III. Hybrids between diploid fibroblasts and other tumour cells. J. Cell. Sci. 8, 681—692.
355. *Wiener F., Klein G., Harris H.* (1974). The analysis of malignancy by cell fusion. V. Further evidence of the ability of normal diploid cells to suppress malignancy. J. Cell Sci. 15, 177—183.
356. *Willis R. A.* (1973). «The Spread of Tumours in the Human Body,» 3rd ed. Butterworth, London.
357. *Winterburn P. J., Phelps C. J.* (1971). Studies on the control of hexosamine biosynthesis by glucosamine synthetase. Biochem. J. 121, 711—720.
358. *Winterburn P. J., Phelps C. F.* (1971) a. The binding of substrates and modifiers to glycosamine synthetase. Biochem. J. 121, 721—730.
359. *Winzler R. J.* (1973). A model for control of oligosaccharide structure in membrane glycoproteins. In «Membrane-Mediated Information» (P. W. Kent, ed.), Vol. 1, pp. 3—19. MTP Med. Tech. Publ., Lancaster, England.
360. *Woodruff J. J., Gesner B. M.* (1969). The effect of neuraminidase on the fate of transformed lymphocytes. J. Exp. Med. 129, 551—567.
361. *Wu H. C., Meezan E., Black P. H., Robbins P. W.* (1969). Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. 1. Glucosamine-labeling patterns in 3T3, spontaneously-transformed 3T3, and SV40-transformed 3T3 cells. Biochemistry 8, 2509—2517.

362. *Yamada K. M., Weston J. A.* (1974). Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 3492—3496.
363. *Yamada K. M., Yamada S. S., Pastan I.* (1976). The major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts is an agglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3158—3162.
364. *Yamada K. M., Olden K.* (1978). Fibronectins: Adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature (London) 275, 179—184.
365. *Yogeeswaran G., Stein B. S., Sebastian H.* (1978). Altered cell surface organization of gangliosides and sialylglycoproteins of mouse metastatic melanoma variant lines selected in vivo for enhanced lung implantation. Cancer Res. 38, 1336—1344.
366. *Yogeeswaran G., Sebastian H., Stein B. S.* (1979). Cell surface sialylation of glycoproteins and glycophingolipids in cultured metastatic variant RNA virus transformed non-producer BALB/c 3T3 cell lines. Int. J. Cancer 24, 193—202.

4

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Брюс Е. Магун и Юджин У. Гернер

4.1. Введение 134
4.2. Кинетика пролиферации в нормальных и трансформированных клетках 135
4.2.1. Изменение во времени прохождения клеточного цикла и его фаз 135
4.2.2. Действие трансформирующих агентов на свойства роста 136
4.2.3. Точки приложения трансформирующей функции в течение клеточного цикла 138
4.3. Действие сывороточных факторов на нормальные и трансформированные клетки 139
4.3.1. Нормальные клетки 139
4.3.2. Трансформированные клетки 140
4.3.3. Продукция ростовых факторов трансформированными клетками 145
4.4. Внутриклеточные факторы, вовлекаемые в регуляцию клеточного роста 147
4.4.1. Циклический АМФ 148
4.4.2. Специфическая экспрессия протеинкиназ 149
4.4.3. Орнитиндекарбоксилаза и уровни полиаминов 152
4.5. Заключение 153
4.6. Указатель литературы 154

4.1. ВВЕДЕНИЕ

Со времени открытия Howard, Pelc (1953) клеточного цикла эукариотов накоплена богатая информация относительно кинетики пролиферации множества клеточных линий и тканевых типов (см. каталог Altman, Katz, 1975). В связи с повышенным интересом к раку и существенными достижениями в его изучении многие исследователи сконцентрировали внимание на том, чтобы понять различия кинетики и регуляции клеточного цикла, существующие в нормальных и злокачественных клетках и тканях (см. обзоры Baserga, 1971; Drewinko, Humphrey, 1977). Трансформация клеток была мощным инструментом при изучении механизмов неопластического роста.

Нормальные клетки большинства тканей можно специфически трансформировать в культуре хорошо известными и простыми средствами (например, вирусом саркомы Рауса с четырьмя известными генами и одним трансформирующим продуктом). Это позволит в деталях сравнить характер опухолевого роста, используя слабо отличающиеся по определенному критерию контрольные клетки. Трансформированные клетки имеют много общих свойств с известными злокачественными клетками, вследствие этого можно проводить интересные биохимические и молекулярные исследования. Необходимо подчеркнуть, однако, что трансформированные клетки — только модель для демонстрации злокачественного роста, с тех пор как стало очевидным, что генетические локусы, контролирующие злокачественность in vivo и экспрессию трансформированного фенотипа in vitro, могут быть разными (Stanbridge, Wilkinson, 1978).

Цель этой главы — оценка нашего представления о различии регуляции кинетики клеточного цикла в нетрансформированных и трансформированных клетках.

4.2. КИНЕТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

4.2.1. Изменения во времени прохождения клеточного цикла и его фаз

Общая характеристика трансформированного состояния клеток — их способность достигать более высокой плотности насыщения при идентичных условиях питания по сравнению с нетрансформированными двойниками (см., например, Holley, 1972). Каким образом в действительности трансформированные клетки в отличие от нетрансформированных достигают плотности насыщения в культуре установить очень сложно, и это всецело зависит от способа трансформации. Есть свидетельство того, что трансформация может уменьшать регуляцию роста путем лишения сыворотки (Bartholomew et al., 1976; Martin, Stein, 1976) и в некоторых случаях замедлять время прохождения клеточного цикла (Magun et al., 1979). Множество результатов указывает на изменения в постмитотической, пресинтетической G_1-фазе при воздействии преимущественно на длительность клеточного цикла (Pardee et al., 1974), другие предполагают, что трансформация может воздействовать на продолжительность S-фазы (Martin, Oppenheim, 1977). Способ трансформации может также повлиять на количество фракций клеток в цикле, так как трансформированные клетки пролиферируют почти до плотности насыщения в культуре. Большой ряд исследований демонстрирует, что некоторые трансформированные клетки не накапливаются в покоящемся G_1-подобном состоянии, когда клеточная плотность увеличивается (Clarke et al., 1970; Paul et al., 1974; Bartholomew et al., 1976; Marthin, Stein, 1976), в то время как другие показывают с очевидностью, что определенные трансформированные клетки могут входить в

покоящееся состояние в отличие от их нетрансформированных двойников (Holley et al., 1976; Moses et al., 1978; O'Neill, 1978; Magun et al., 1979). Жизнеспособность трансформированных клеток в течение пролиферации также весьма изменчива и зависит от способа трансформации. Клеточный обмен или гибель могут быть весьма высокими в определенных трансформированных клетках, особенно в тех их культурах, в которых клетки не делятся или находятся в покоящемся состоянии при высокой клеточной плотности. Таким образом, кинетика клеточной пролиферации трансформированных клеток может отличаться от таковой нормальных клеток, по крайней мере, в четырех направлениях. Во-первых, общее время прохождения клеточного цикла (T_C) может увеличиваться или уменьшаться. Во-вторых, продолжительность индивидуальной фазы клеточного цикла, особенно T_{G_1} и T_S, может изменяться. Неизвестно, являются ли эти изменения во времени взаимозависимыми или независимыми. В-третьих, распределение клеток по клеточному циклу может изменяться, и некоторые трансформированные клетки способны достичь состояния покоя, а другие не способны к этому. В-четвертых, скорость клеточного обмена может значительно изменяться.

4.2.2. Действие трансформирующих агентов на свойства роста

Общее свойство, которым, как предполагалось, обладают трансформированные клетки,— отсутствие контроля нормального развития, когда клетки достигают высокую плотность роста (Clarke et al., 1970; Paul et al., 1974; Bartholomew et al., 1976). Интенсивные исследования клеток, трансформированных ДНК-содержащими (особенно SV40) вирусами, показали, что распределение по фазам клеточного цикла не изменялось в процессе их трансформации даже в условиях высокой плотности культур. При этом подразумевалось, что трансформированные клетки утрачивали способность останавливать свой рост в таких условиях, в которых нормальные клетки делали это достаточно эффективно.

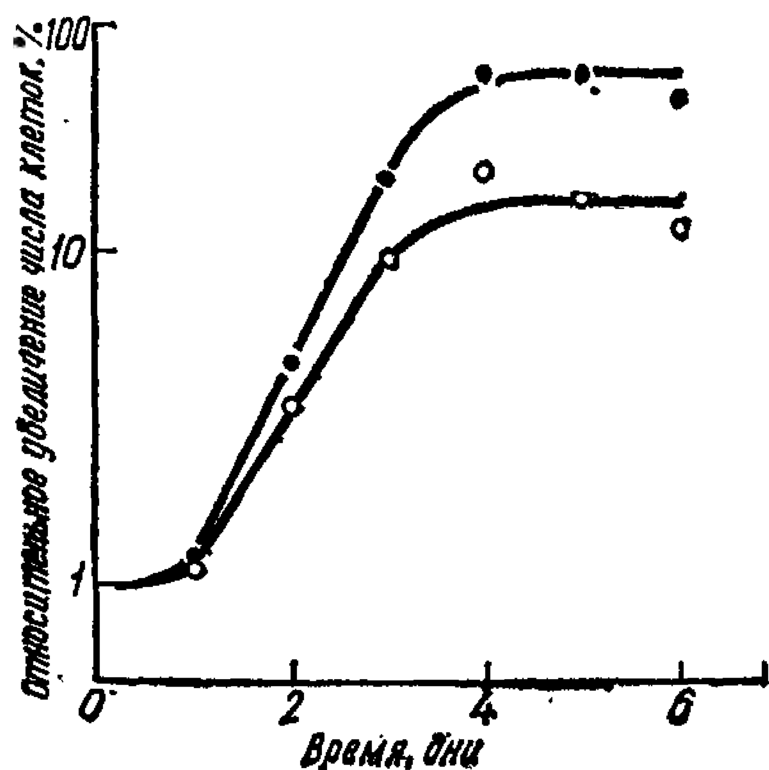
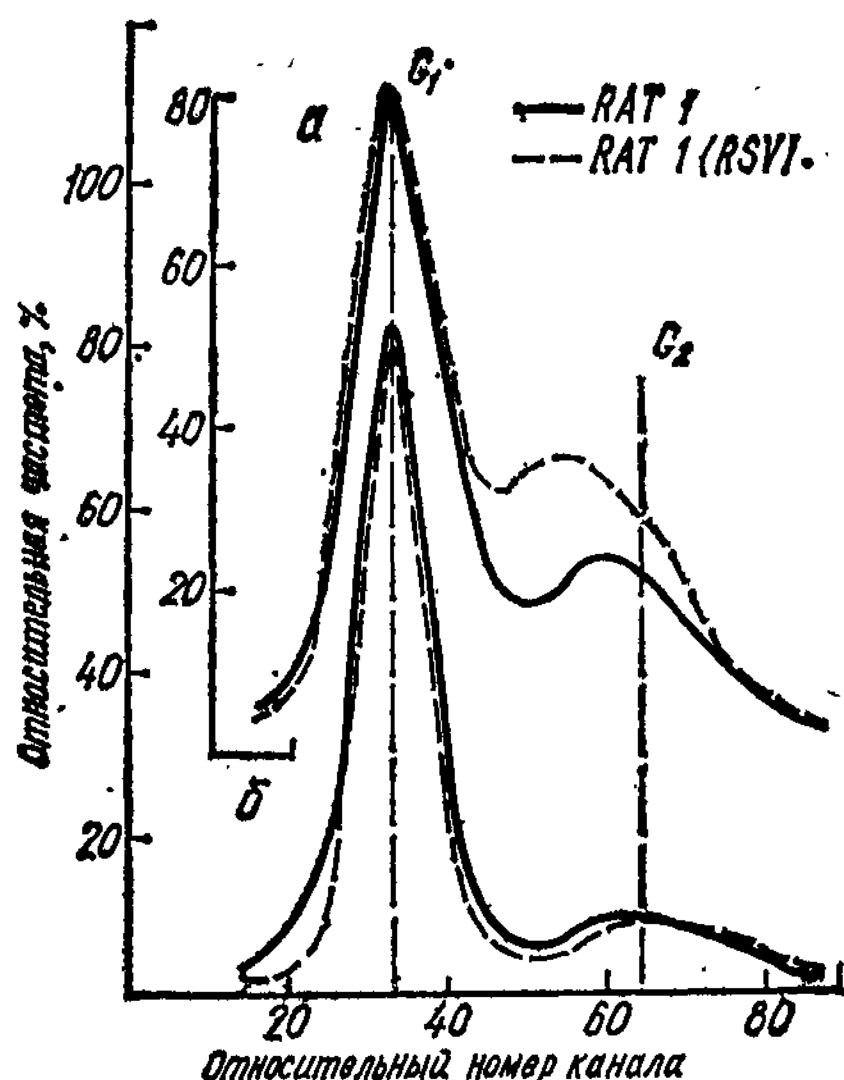


Рис. 1. Кривые роста клеток в среде, содержащей 20 % сыворотки. Клетки Rat1 (●) и Rat1 (wt/RSV) (○) были рассажены в модифицированной среде Дальбекко (ДМС), содержащей 20 % эмбриональной сыворотки в 60-миллиметровых пластиковых чашках (Lux Corp; Newbury Park California) при плотности 1 × 10^4 клеток/см^2. Культуры росли при 39 °C с 5 % CO_2. Ежедневно клетки из трех чашек каждой группы, например Rat1 (RSV) и Rat1 (RSV), трипсинизировали и подсчитывали на счетчике Coulter counter (Coulter Electronics, Hialeah, Florida). Каждая точка представляет среднее значение трех чашек.

Рис. 2. Распределение ДНК культур крысиных фибробластов: *а* — распределение ДНК нетрансформированных клеток Rat 1 (———) и трансформированных клеток Rat1 (wt/RSV) (— — —), когда обе культуры росли экспоненциально; *б* — распределение тех же клеток после 54 ч выращивания без сыворотки. По оси абсцисс представлен номер канала многоканального анализатора, который пропорционален относительному содержанию ДНК, приходящемуся на клетку. По оси ординат — относительная частота клеток, приходящаяся на канал (из работы Magun et al., 1979).



Недавно было обнаружено, что определенные опухолевые клетки могут ограничивать свой рост, другими словами, входить в покоящееся G_1-подобное состояние так же, как и нетрансформированные клетки (Holley et al., 1976; Moses et al., 1978; O'Neill, 1978; Magun et al., 1979; Dubrow et al., 1979). Один такой пример — клетки, трансформированные вирусом саркомы Рауса (RSV), который является РНК-содержащим опухолеродным вирусом. В противоположность клеткам, трансформированным ДНК-содержащими онкогенными вирусами, эмбриональные фибробласты Rat 1, трансформированные RSV, растут более медленно, чем нетрансформированные фибробласты (рис. 1). В условиях истощения сыворотки эти трансформированные RSV фибробласты накапливаются в G_1-подобной фазе и клеточная пролиферация значительно уменьшается (рис. 2). Результаты сравнительного изучения, полученные Dubrow и соавт. (1979), показали, что способ трансформации является центральным для определения измененного характера роста трансформированных клеток. Несколько химически трансформированных культур обнаруживали общие с трансформированными RSV клетками свойства роста, потому что они были способны войти в покоящееся G_1-подобное состояние в определенных условиях. В соответствии с предыдущей работой Dubrow и соавт. (1979) обнаружили, что клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, были неспособны регулировать рост путем перехода в состояние покоя, даже при высоких клеточных плотностях. Таким образом, в то время как трансформированные клетки в общем разделяют с нетрансформированными многие морфологические и биохимические свойства, они могут различаться механизмами, с помощью которых способны регулировать свой собственный рост.

4.2.3. Точки приложения трансформирующей функции в течение клеточного цикла

В последнее десятилетие было разработано несколько гипотез, в частности, гипотеза, по которой трансформирующая функция, осуществляемая в пределах клеточного цикла, вызывает изменения роста в трансформированных клетках. Pardee (1974) предположил, что нормальные клетки имеют точку ограничения в фазе G_1, которая лимитирует рост при множестве условий. Замысел идеи заключался в том, что все условия включают изменение состояния плазменной мембраны. Pardee постулировал, что трансформирующая функция, по крайней мере, для опухолеродных вирусов действует на эту точку ограничения в клеточном цикле таким способом, что этот контроль выключается. Еще раньше онкологи описали опухоли in vivo (Burns, Tannock, 1970), и было хорошо известно, что растущая фракция многих солидных опухолей у человека была существенно меньше, чем остальная, подразумевая значительную неделящуюся популяцию.

Последовательно Smith и Martin (1973) постулировали общую модель клеточной пролиферации, предполагая, что все клетки входят в фазу покоя вслед за делением и что способность роста определяется вероятностью функции перехода, описывающей скорость выхода из состояния покоя в пролиферативный пул. В терминах дискуссии, представленной здесь, трансформированные ДНК-опухолеродными вирусами клетки имели очень высокую вероятность перехода, недолго находились в покоящемся состоянии, в то время как трансформированные РНК-опухолеродными вирусами клетки имели более низкую вероятность перехода в условиях высокой клеточной плотности и накапливались в G_1-подобном неделящемся состоянии. Предложенная модель подвергалась интенсивной критике в связи с тем, что она не является обобщающей и строго не подкреплена соответствующими экспериментальными данными (Yen, Pardee, 1979). Основная суть дебатов заключается в следующем: регулируется ли клеточная пролиферация детерминирующими или вероятностными механизмами. Модель была недавно модифицирована, для того чтобы включить две случайные точки перехода, специфические для постмитотических, пресинтетических клеток, которые неактивно проходят по клеточному циклу (Brooks, 1980). К сожалению, ни модели Pardee (1974) и Smith, Martin (1973), ни пересмотренная модель Smith и Martin (Brooks et al., 1980) не указывают на возможные точки ограничения или регуляции вне G_1-фазы, несмотря на существующие точки регуляции в S-фазе как в нормальных, так и в трансформированных клетках (Martin, Oppenheim, 1977) и, вероятно, точки регуляции в G_2-фазе (Tobey, Hildenbraud, 1977).

Недавняя работа Dubrow и соавт. (1979) и результаты, представленные здесь, позволяют обращаться к общим аспектам регуляции роста в трансформированных клетках. Pardee использовал понятие «неполное блокирование регуляции», которое согласуется с концепцией различной степени регуляции роста в зависимости от агента,

используемого для трансформации. Такие точки регуляции нормального клеточного роста, которые изменяли бы кинетику клеточной пролиферации, все еще неизвестны (как их число, так и локализация по фазам клеточного цикла). Это, однако, не означает, что регуляция роста отсутствует в трансформированных клетках. Некоторые механизмы, с помощью которых может изменяться клеточная пролиферация, будут обсуждены в следующих разделах этой главы.

4.3. ДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ ФАКТОРОВ НА НОРМАЛЬНЫЕ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

4.3.1. Нормальные клетки

Нетрансформированные клетки блокировались в G_1-фазе клеточного цикла, когда они достигали специфической плотности в результате истощения сывороточных ростовых факторов; в среде, дефицитной по сыворотке, они будут блокированы при достижении разреженного монослоя (Nilausena, Green, 1965; Pardee, 1974; Prescott, 1976). Клеточную плотность, достигаемую при этом, определяли количеством сыворотки, присутствующей в культуральной среде (Holley, Kiernan, 1971). Блок — обратим, так как синтез ДНК и клеточная пролиферация возобновляются при добавлении свежей сыворотки (Todaro et al., 1965; Temin, 1971). После добавления свежей сыворотки к истощенным по сыворотке культурам синтез ДНК возобновляется после латентного (lag) периода 8—12 ч (Burk, 1970; Temin, 1971). Пропорция клеток, стимулированных к синтезу ДНК, зависит от концентрации используемой сыворотки (Clarke et al., 1970), однако на продолжительность lag-периода концентрация сыворотки не влияет (Temin, 1971).

Brooks (1976) осуществил эксперименты, используя нетрансформированные клетки 3T3, которые были покоящимися и затем стимулированы 10 % сыворотки. Через 12—20 ч среда, содержащая 10 % сыворотки, была замещена средой, содержащей 0,25 % сыворотки. Во всех случаях скорость входа клеток в S-фазу (вероятность перехода), индуцированная 10 % сыворотки, уменьшалась через 5 ч после снижения концентрации сыворотки. Следовательно, включение синтеза ДНК не происходило раньше, чем за 5 ч до начала S-фазы. При повышении концентрации сыворотки требовалось 12—14 ч прежде, чем станет заметен увеличенный вход клеток в S-фазу. Эти результаты предполагали, что, по крайней мере, две различные клеточные активности были важны для поддержания вероятности перехода.

Lindgren и Westermark (1977) использовали глиальные клетки человека, остановленные в росте при высокой плотности или истощении сыворотки. Добавление свежей сыворотки требовало 12 ч прежде, чем синтез ДНК возобновлялся. Затем они использовали кратковременные импульсные метки сывороти вслед за нестимулированными паузами для того, чтобы определить продолжительность времени, необходимого для стимуляции синтеза ДНК. Они

обнаружили, что стимулированные сывороткой клетки в G_1-фазе постепенно возвращались обратно к начальной точке G_1-фазы, когда сыворотка удалялась. Период полужизни данной перестройки составлял 1—3 ч даже после 8-часовой обработки сывороткой.

4.3.2. Трансформированные клетки

4.3.2.1. Клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами

Одна из наиболее постоянных особенностей трансформированных клеток заключается в повышенной плотности клеток in vitro по сравнению с их нетрансформированными аналогами. В противоположность нетрансформированным аналогам клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, такими, как SV40, не останавливают свой рост в G_1-фазе. Вместо этого они блокируются через клеточный цикл или продолжают пролиферировать до тех пор, пока не отлипают от подложки или погибают (Paul, 1973; Prescott, 1976; Pardee, 1974; Bartholomew et al., 1976). Время удвоения числа нетрансформированных клеток 3T3 при концентрации сыворотки ниже 8 % настолько удлинялось, что далее оставалось неизмеряемым, однако трансформированные SV40 клетки имели время удвоения, увеличивающееся только в два или три раза при концентрациях сыворотки от 4 до 1 % (Bartholomew et al., 1976).

Martin, Stein (1976) осуществили эксперименты, используя клетки CHL, трансформированные SV40 и термочувствительным мутантом вируса А-типа (ts A239). Истощение сыворотки приводило к блоку нетрансформированных клеток, в то время как трансформированные диким типом вируса или термомутантом ts A239 клетки при пермиссивной температуре откреплялись от подложки. При непермиссивной температуре клетки ts A239 напоминали по своему поведению нормальные клетки. Сдвиг от непермиссивной температуры к пермиссивной остановленных в росте клеток ts A239 приводил к началу синтеза ДНК более чем за 1,5 дня. Авторы предположили, что трансформированные SV40 клетки были дефектны не только по их способности оставаться в покоящемся состоянии, но и по их способности входить в фазу покоя.

4.3.2.2. Клетки, трансформированные РНК-содержащими опухолеродными вирусами

Клетки, трансформированные РНК-содержащими опухолеродными вирусами, отвечают на сывороточные факторы не так, как клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами. Для того чтобы изучить действующий контроль сыворотки в трансформированных РНК-содержащими опухолеродными вирусами клетках, мы сравнивали нетрансформированные Rat1 клетки и трансформированные (Rat1 wt/RSV) так же, как мы это делали с клетками L A24, трансформированными термочувствительными мутантами вируса саркомы Рауса (Rat1 ts RSV). Нетрансформиро-

ванные Rat1 клетки имели укороченное время удвоения, составляющие 12,5 ч по сравнению с клетками Rat1 (wt/RSV) — 15,5 ч (см. рис. 1). Кроме того, клетки Rat1 достигают более высокой плотности популяции по сравнению с трансформированными клетками Rat1. Последнее свойство является результатом закисления среды и лизиса клеток, которые наблюдаются в культурах Rat1 (wt/RSV) при высокой плотности. Однако трансформированные клетки достигали более высокой плотности насыщения, чем нетрансформированные, когда продолжительно проводилось дополнительное питание культуры (данные не показаны). Как показали результаты проточного микрофлюориметрического анализа (см. рис. 2), клетки Rat1, так же как и Rat1 (wt/RSV), останавливались в G_1-фазе клеточного цикла вслед за истощением сыворотки. Однако скорость синтеза ДНК в покоящихся, лишенных сыворотки клетках Rat1 (wt/RSV) была выше (0,8 % в час), чем в нетрансформированных клетках Rat1 (0,2 % в час) (Magun, Bowden, 1980). Такие значения скорости синтеза ДНК определяли измерением количества меченой ^{14}C ДНК, реплицирующейся вслед за сывороточной стимуляцией через различные интервалы времени до 30 ч. Процент вновь реплицируемой ДНК определялся по сдвигу плотности нормальной ДНК в сторону плотности гибридной ДНК как результат инкорпорации метки в тяжелую плотность (Magun et al., 1979; Magun, Bowden, 1980). Когда лишенные сыворотки клетки Rat1 и Rat1 (wt/RSV) стимулировались добавлением сыворотки, обе клеточные линии начинали синтезировать ДНК через 8—10 ч после добавления сыворотки, но общая скорость синтеза ДНК была выше в нетрансформированных клетках Rat1 — 11 % в час, чем в клетках Rat1 (wt/RSV) — 4 % в час (Magun et al., 1979). В том же исследовании клетки Rat1, трансформированные термочувствительным мутантом RSV, вели себя как трансформированные клетки при пермиссивной температуре (35 °C) и как нетрансформированные клетки при непермиссивной температуре (30 °C). Общая скорость синтеза ДНК была значительнее при более высокой температуре, чем при низкой. В противоположность результатам, полученным при исследовании трансформированных SV40 клеток (Martin, Stein, 1976), лишенные сыворотки клетки Rat1 (wt/RSV), содержавшиеся при 39 °C, а затем при 35 °C, начинали синтезировать ДНК через 12 ч с максимальной скоростью подобно клеткам Rat1(wt/RSV) (Magun et al., 1979). Температура 35 или 39 °C не изменяла скорости синтеза ДНК в клетках Rat1 или Rat1 (RSV). Следовательно, трансформированные клетки более чувствительны к сывороточным факторам, так как в присутствии сыворотки скорость пролиферации этих клеток и вероятность их вхождения в S-фазу были выше. Результаты сравнения вероятности вхождения в фазу синтеза ДНК клеток Rat1 и Rat1 (wt/RSV), лишенных сыворотки, показаны на рис. 3. Лишенные сыворотки клетки были стимулированы сывороткой в присутствии ^{3}H-тимидина для того, чтобы получить кривую Smith — Martin вероятности прохождения по циклу, полученную с помощью радиоавтографического анализа. В то время как клетки Rat1 (RSV) входят в S-фазу раньше, чем клетки Rat1 (определено

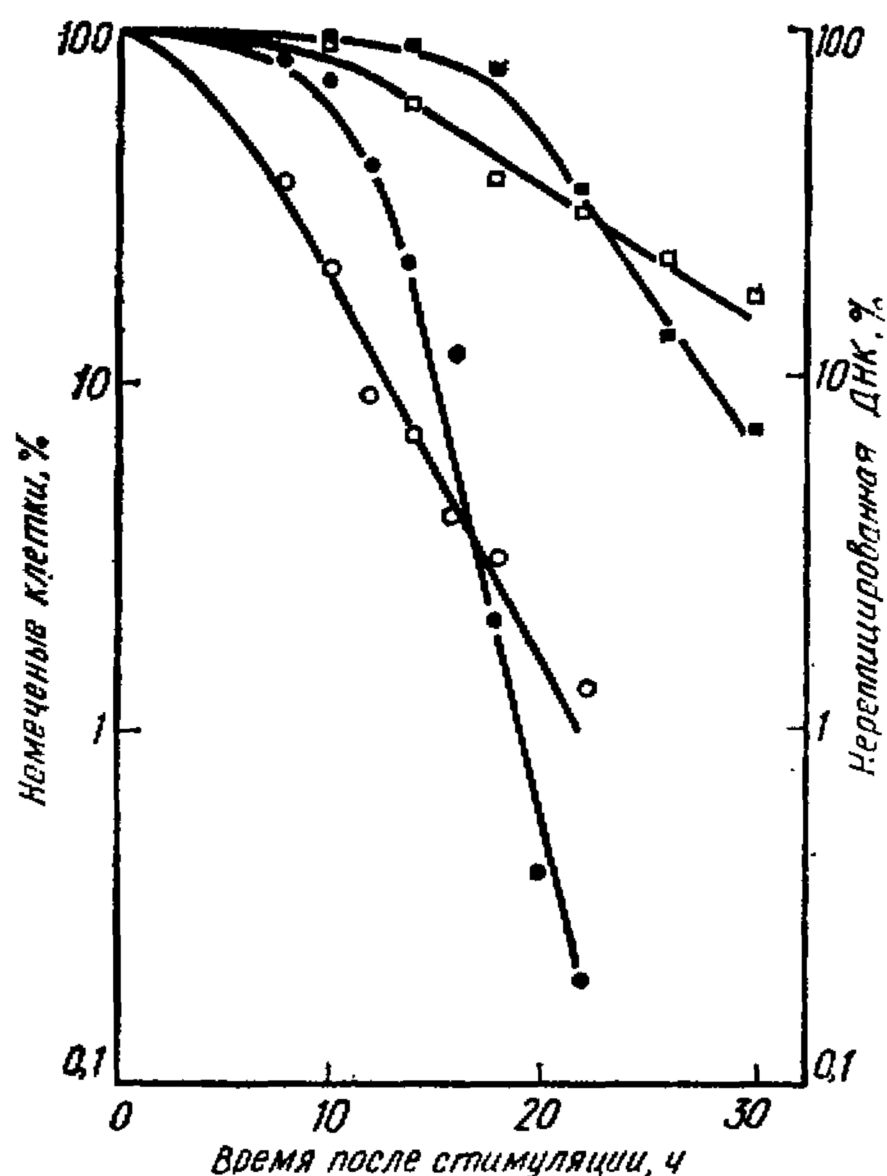


Рис. 3. Фракции клеток, остающихся в G_1-фазе, и фракции ДНК, не реплицируемой после добавления сыворотки к покоящимся клеткам. Индексы метки были получены после продолжительной обработки клеток Rat1 (●) и Rat1 (RSV) (○) в среде ДМС, содержащей 20 % сыворотки и ^{3}H-тимидин (1 мк/Ки/мл). Разреженный монослой культур на покровных стеклах содержался в среде, лишенной эмбриональной сыворотки на 54 ч, для перевода клеток в покоящееся состояние. В это время оба типа клеток обладали микрофлюориметрическими профилями, характерными для G_1-фазы (см. рис. 1). С двухчасовым интервалом, начиная с 8 ч, культуры фиксировали и покрывали эмульсией (Kodak NTB-2). Авторадиограммы проявляли 7 дней спустя и процент немеченных клеток определяли на 1 000 клеток в каждой точке. Процент нереплицируемой ДНК для клеток Rat1 (■) и Rat1 (RSV) (□) определяли, как описано прежде (Magun et al., 1979). Кратко, клетки метились ^{14}C-тимидином за 2 дня до индукции в среде ДМС, лишенной эмбриональной сыворотки на 54 ч, при 39 °С. В это время ($t = 0$) среду в чашках заменяли свежей ДМС, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл 5′-бромдезоксиуридина (BrdUrd) и 0,1 мкг/мл 5′-флюородезоксиуридина (FdUrd). Вновь реплицируемую ДНК определяли после центрифугирования ДНК, изолированной из культур при t = 10, 14, 18, 22, 26 и 30, в нейтральном градиенте хлористого цезия (CsCl) (незамещенная плотность ДНК-1,75 г/мл). Процент нереплицируемой ДНК определяли процентом ДНК, которая не достигала гибридной плотности, деленной на общее количество присутствующей ДНК.

радиоавтографически), скорость входа популяции в S-фазу значительно меньше, чем клеток Rat1. Клетки Rat1 (RSV) начинали входить в S-фазу несколькими часами раньше клеток Rat1. В параллельном эксперименте, показанном на том же рисунке, количество ДНК, реплицируемой полуконсервативно, определялось плотностью инкорпорированной метки во вновь созданную ДНК. Соответственно началу S-фазы, определяемой методом радиоавтографии, переход к постоянной скорости репликации ДНК наблюдался позже в клетках Rat1 по сравнению с клетками Rat1 (RSV). К тому же конечная скорость репликации ДНК была ниже в трансформированных клетках. На рис. 4 продемонстрировано, что различия входа в S-фазу и ее прохождения поддерживались в течение G_2-фазы и входа в последующие фазы клеточного цикла. Клетки Rat1(wt/RSV), для которых показаны начало входа в S-фазу и ее прохождение на 8 ч раньше по сравнению с клетками Rat1, начинают делиться также примерно на 8 ч раньше. В дальнейшем скорость клеточного деления была больше в клетках Rat1 по сравнению с клетками Rat1(wt/RSV). Таким образом, различия вероятности входа в S-фазу сохраняются в следующем клеточном цикле.

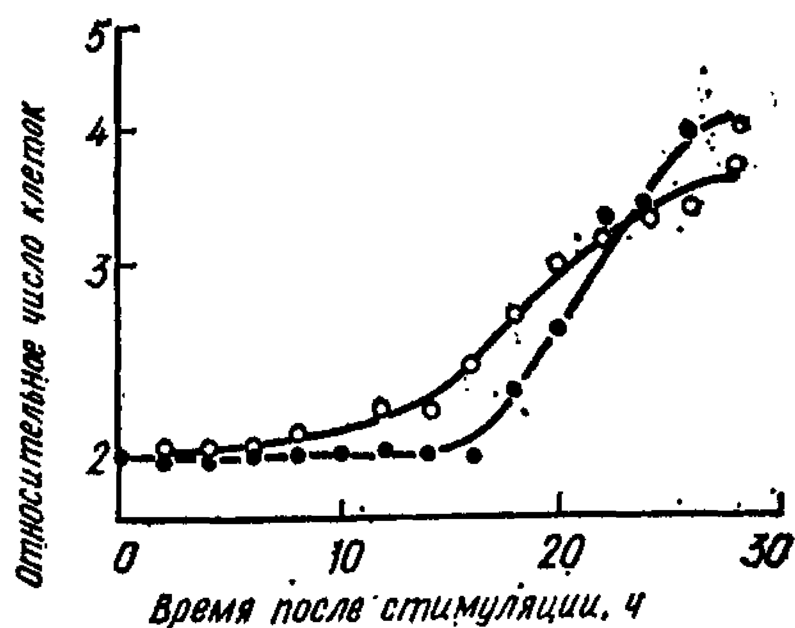


Рис. 4. Относительное увеличение числа клеток после стимуляции покоящихся клеток средой ДМС, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки. Клетки Rat1 и Rat1 (RSV) рассаживали при плотности 1 × 10^4 клеток/$см^2$ в 60-миллиметровые пластиковые чашки при 39 °С. Через 48 ч среду заменяли на ДМС без эмбриональной сыворотки. Через 54 ч ($t = 0$), когда клетки достигали G_1-профиля в проточном микрофлюориметрическом анализе (см. рис. 1), среду заменяли на ДМС, содержащую 20 % эмбриональной сыворотки. С 2-часовыми интервалами три чашки клеток Rat1 и Rat1 (RSV) удаляли для измерения числа клеток после трипсинизации в счетчике Coulter. С целью сравнения измеряемое число клеток нормализовали до их относительного числа.

Результаты, представленные на рис. 3, указывают на существование значительного промежутка времени между входом в S-фазу, определяемого с помощью радиоавтографии ^{3}H-тимидином, и синтеза значительного количества ДНК. Например, через 14 ч после добавления сыворотки к покоящимся клеткам Rat1(wt/RSV) 95 % ядер были мечеными, но только 20 % ДНК реплицировалось. Для тестирования возможного существования точки ограничения в ранней S-фазе в клетках Rat1 и Rat1(wt/RSV) были проведены следующие эксперименты. Клетки лишали сыворотки на 48 ч, в это время ($t = 0$) ^{3}H-тимидин добавляли в одиночный набор культур. В то же время метку плотности BrdUrd добавляли в парные наборы культур. Через 30 ч число меченых ядер подсчитывалось для первого комплекта, а количество полуконсервативно меченой ДНК определяли во втором комплекте (табл. 1). В клетках Rat1 метились только 5 % ядер, в то время как в культурах Rat1(RSV) 56 %. Однако если среда за-

Таблица 1. **Индексы метки покоящихся клеток Rat1 и Rat1 (wt/RSV) через 30 ч после добавления ^{3}H-тимидина**

Условия эксперимента	Истощенная среда без сыворотки		Свежая среда без сыворотки	
	Rat1	Rat1 (wt/RSV)	Rat1	Rat1 (wt/RSV)
Меченые ядра к 30 ч, % (1)	5	56	66	73
Реплицируемая ДНК к 30 ч, % (2)	9	40	10	40

Примечание. Культуры клеток Rat1 и Rat1 (RSV), некоторые из которых метили ^{14}C-тимидином (2) при выращивании на покровных стеклах (1) или в пластиковых чашках диаметром 60 мм (2) в среде, содержащей 10 % сыворотки. При достижении разреженного монослоя среду заменяли на среду без сыворотки, в которой клетки оставляли 48 ч. В это время ($t = 0$) ^{3}H-тимидин (1 мкКи/мл) добавляли к культурам на покровных стеклах (1) либо прямо в истощенную среду без сыворотки. Через 30 ч покровные стекла удаляли и подвергали радиоавтографии, как указано на рис. 3. К клеткам, меченным ^{14}C-тимидином (2), при $t = 0$ добавляли BrdUrd как метку плотности (см. рис. 3) либо прямо в истощенную среду без сыворотки, либо в свежую среду без сыворотки. Через 30 ч клетки собирали и процент реплицируемой ДНК определяли в градиенте плотности CsCl, как показано на рис. 3.

менялась свежей средой без сыворотки при $t = 0$, то сходные индексы метки были обнаружены 30 ч спустя для клеток Rat1 и Rat1(RSV). В условиях свежей или старой среды без сыворотки 10 или 40 % ДНК реплицировалось через 30 ч в клетках Rat1 и Rat1(RSV) соответственно.

Упомянутые выше эксперименты указывают на то, что нетрансформированные клетки, блокированные с содержанием ДНК, характерным для G_1-фазы, стимулируются свежими питательными веществами (исключая сыворотку) для продвижения по направлению к границе G_1/S. Возможно, эти клетки становятся заблокированными в ранней S-фазе. Клетки Rat1(RSV) блокировались в среде без сыворотки ближе к границе G_1/S (см. рис. 3) и могут быть остановлены в точке ограничения ранней S-фазы. Важное различие нетрансформированных и трансформированных RSV линий заключается в том, что трансформированные клетки способны выйти за точку ограничения в отсутствие сыворотки, в то время как нетрансформированные клетки обязательно нуждаются в сыворотке для преодоления точки ограничения. Как упоминалось прежде, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами клетки имеют сниженную способность входа в покоящееся состояние, но, будучи остановленными, не обладают повышенной способностью к ускольванию (Martin, Stein, 1976). Как установлено в нашей лаборатории, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами клетки входят в покоящееся состояние в отсутствие сыворотки, но имеют более высокую вероятность выхода из этого состояния по сравнению с нетрансформированными клетками. Интересно, что нетрансформированные клетки намного более чувствительны к сывороточным факторам, чем трансформированные клетки. В следующем разделе мы рассмотрим сывороточные факторы и чувствительность нетрансформированных и трансформированных клеток.

4.3.2.3. Клетки, трансформированные химическими канцерогенами

Изучение клеточной трансформации в клетках под влиянием опухолеродных вирусов имеет то преимущество, что трансформированный фенотип обусловлен действием продукта единичного гена. Однако заключения, полученные в подобных исследованиях, должны смягчаться пониманием того, что большинство злокачественных новообразований человека является результатом индукции, вызванной химическими канцерогенами (Heidelberger, 1977). Очевидное неудобство использования химически трансформированных клеток заключается в том, что их «трансформированный» фенотип различен в подобных популяциях. Следовательно, становится трудным обобщать молекулярные изменения, встречающиеся в химически трансформированных клетках, так как такие трансформированные клеточные линии отличаются одна от другой различными путями индукции.

O'Brien, Diamond (1977) обнаружили, что нормальные и трансформированные бенз(а)піреном эмбриональные клетки хомячка за-

держивали свой рост при достижении плотности. Добавление свежей сыворотки было достаточным, чтобы стимулировать синтез ДНК в обоих клеточных типах через 6 ч. Holley и соавт. (1976) сравнили ответы на сыворотку клеток 3Т3 и их трансформированных бенз(а)-пиреном и SV40-аналогов. Нетрансформированные и трансформированные бенз(а)пиреном клетки останавливали рост при высокой плотности и низком содержании сыворотки (0,2 %). Однако химически трансформированная линия обнаруживала сниженную потребность в сывороточном факторе роста типа ростового фактора фибробластов. Как упоминалось в разделе 3.2.2, трансформированные SV40 клетки 3Т3 не задерживали свой рост.

Moses и соавт. (1978) сравнили характер роста линий, выделенных из мышиных эмбриональных клеток, с двумя линиями, трансформированными 3-метилхолантреном. Все клеточные линии останавливали свой рост после достижения высокой плотности. Стимуляция клеток добавлением свежей среды с 10 % сыворотки приводила к индукции синтеза ДНК во всех клеточных линиях, однако в химически трансформированных клетках эта индукция наблюдалась после значительно более короткого lag-периода. Однако ни сывороточный, ни эпидермальный, ни фибробластный ростовые факторы не были способны стимулировать трансформированные клетки. По-видимому, покоящееся состояние, наблюдаемое в трансформированных клеточных линиях, явилось результатом существенного истощения аминокислот или других питательных веществ низкой молекулярной массы скорее, чем истощения макромолекулярных сывороточных факторов.

4.3.3. Продукция ростовых факторов трансформированными клетками

Пролиферация клеток в культуре, как было установлено, зависит от присутствия макромолекулярных факторов роста в сыворотке (Holley, Kiernan, 1968; Temin, 1971). Хотя многие факторы роста, включая факторы роста эпидермиса, нервов, фибробластов, тромбоцитов и сомы, были идентифицированы и выделены из сыворотки, эпидермальный фактор роста (ЭФР) — биологически наиболее активен и лучше всех указанных факторов изучен (Carpenter, Conen, 1978).

Регуляция пролиферации культивируемых фибробластов ЭФР изучалась интенсивно в последние несколько лет (Carpenter et al., 1976a; Cohen et al., 1975; Hollenberg, Cautrecasas, 1973, 1975) по следующим причинам: ЭФР — один из нескольких известных митогенов, большое количество (мг) которого можно получить в чистой форме, необходимой для культуральных и радиорецепторных исследований, в которых 100-кратное превышение немеченого гормона требуется для определения специфичности связывания; многие линии фибробластов и их химически и вирус-трансформированных дериватов использовались в качестве модельных систем для исследования зависимого от плотности ингибирования и роли сывороточных

и других факторов в контроле роста. Когда фибробласты человека продолжительно выращивали в присутствии 4 нг/мл ЭФР, клетки утрачивали высокую потребность к сыворотке и не ограничивались плотностнозависимым ингибированием, достигая плотности популяции в 4—6 раз выше, чем в контроле (Carpenter, Cohen, 1976a). Исследования, направленные на выяснение молекулярных механизмов действия ЭФР, определили, что связывание ^{125}I-ЭФР с поверхностью культивируемых клеток насыщенно и специфично (Carpenter et al., 1975; Carpenter, Cohen, 1976; Cohen et al., 1975).

В 1976 г. Todaro и De Larco сообщили, что клетки 3T3, трансформированные саркоматозными вирусами мышей и кошек (РНК-содержащими опухолеродными вирусами), утрачивали рецепторы к ЭФР в результате вирусной трансформации. В клетках, трансформированных ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, такими, как SV 40 и полиомы, или клетках, инфицированных нетрансформирующими РНК-содержащими опухолеродными вирусами, изменения не обнаружены. В дальнейшем, исследуя это явление, Todaro и соавт. (1977) показали, что индуцированная саркомным вирусом утрата связывания ЭФР не являлась главным вкладом в общее снижение связывания ростового фактора. Связывание множественно стимулирующей активности (МСА) потенциальным митогеном для культивируемых клеток (Dulak, Temin, 1973) было неудачным при вирусной трансформации. Todaro и соавт. (1977) обнаружили, что две линии фибросаркомы человека связывали незначительное количество МСА по сравнению с нормальными фибробластами, в то время как их способность связывать ЭФР уменьшалась.

De Larco и Todaro (1978) сообщили, что трансформированные саркомными вирусами мышей и кошек клетки продуцировали в культуральную среду вещества (их масса выражалась в нанограммах), обратимо индуцирующие нормальные клетки к росту в мягком агаре и вызывали в этих клетках, лишенных сыворотки, индукцию синтеза ДНК. Эти вещества, названные авторами саркомными ростовыми факторами,— пептиды с молекулярной массой от 7000 до 25 000 Д. Все три класса идентифицированных саркомных ростовых факторов были способны конкурировать с ^{125}I-ЭФР за связывающие с помощью ЭФР места на клетках. Авторы заключили, что эти факторы проявляют на фибробластах свойства трансформации, наблюдаемые после трансформации саркомными вирусами. Клеточные линии, выделенные из фибросарком человека, которые имели сниженное количество рецепторов для МСА, секретируют в культуральную среду полипептидные факторы, конкурирующие за рецепторы для МСА (Todaro, De Larco, 1978). Todaro и De Larco (1978) предложили гипотезу, что один из путей, благодаря которому клетки становятся злокачественными,— эндогенная продукция факторов, для которых они имеют рецепторы. Следовательно, клетки продолжительно отвечают на стимул и освобождаются от зависимости от экзогенных сывороточных факторов. По-видимому, малое количество доступных рецепторов ростовых факторов на трансформированных клетках могут наблюдаться в результате оккупации рецепторов эндогенно секретируемыми

факторами или снижения регуляции рецепторов, индуцированных постоянной продукцией ростовых факторов.

Мы осуществили исследование, подобно описанному Todaro, с целью установить связь изменений в контроле роста клеток Rat1 (wt/RSV) с продукцией саркомных ростовых факторов. Используя анализ ^{125}I-ЭФР-связывания клетками Rat1 и Rat1 wt/RSV), мы обнаружили, что трансформированные клетки имели 10 % числа рецепторов ЭФР нетрансформированных клеток (Martisian Magun, 1979). В отличие от их нетрансформированных двойников лишенные сыворотки клетки Rat1 (wt/RSV) не синтезировали ДНК в ответ на ЭФР. Культуральная среда, в которой выращивали клетки Rat1 wt/RSV), содержала вещества, способные конкурировать с ^{125}I-ЭФР за связывание клеток Rat1. Оказалось, что в клетках, трансформированных птичьими саркоматозными вирусами, индуцируется трансформация подобно трансформации, вызванной саркоматозными вирусами мышей и кошек.

Мы выдвинули гипотезу, что изменения контроля роста, наблюдаемые в трансформированных RSV клетках Rat1 (см. раздел 3.2),— результат продукции саркомных ростовых факторов. Больший ответ нетрансформированных клеток Rat1 на сыворотку по сравнению с клетками Rat1 (RSV) может наблюдаться как результат большего числа рецепторов для ЭФР на клетках Rat1. Таким образом, ЭФР или ЭФР-подобные ростовые факторы в сыворотке могли бы быть ответственны за бóльшую вероятность продвижения клеток Rat1 по фазам клеточного цикла вслед за стимуляцией сывороткой по сравнению с таковой клеток Rat1 (RSV). Эндогенная продукция саркомных ростовых факторов клетками Rat1(RSV) ответственна за бóльшую вероятность продвижения клеток в условиях выращивания в безсывороточной среде. Все результаты исследования клеток Rat1, проведенные в нашей лаборатории, указывают на то, что нетрансформированные и трансформированные RSV клетки входят в постмитотическое покоящееся состояние идентично, но способность трансформированных клеток продуцировать свой собственный ростовой фактор может быть ответственной за их свойство ускользать из активной части клеточного цикла при условии истощения сыворотки.

4.4. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ, ВОВЛЕКАЕМЫЕ В РЕГУЛЯЦИЮ КЛЕТОЧНОГО РОСТА

Значительная часть этого тома касается множества цитоплазматических изменений, встречающихся при клеточной трансформации. Цель данного раздела — обсуждение нескольких специфических событий, которые, как думается, ответственны за контроль синтеза ДНК в нормальных клетках, и как эти события могут изменяться при трансформации. События, выбранные для дискуссии, вытекают из предыдущих дискуссий, описанных в этой главе, а именно из гипотезы, выдвинутой первоначально Pardee (1974), которая предполагает, что рост клеток регулируется точкой ограничения в G_1-фазе. Вирусные трансформирующие функции, как думали, действуют

в этой точке, возможно, модифицируя состояние плазменной мембраны. Эта точка была эквивалентна точке роста, регулируемой действием циклического АМФ (цАМФ). Более недавние исследования предположили, что, по крайней мере, один энзим, который может быть индуцирован через цАМФ-зависимый механизм,— орнитиндекарбоксилаза (ОДК) (Bachrach, 1975), энзим, лимитирующий скорость биосинтеза полиаминов (Russel, Snyder, 1968). В дальнейшем появились основания, что ОДК, во-первых, индуцируется вблизи точки ограничения Pardee в G_1-фазе (Russell, Stambrook, 1975; Fuller et al., 1977); во-вторых, является очень лабильным протеином (Russell, Snyder, 1968) и, в-третьих, индукция его важна для перехода из G_1- в S-фазу в связи с необходимостью полиаминов для синтеза ДНК (Fillingame et al., 1975). Таким образом, этот раздел будет сконцентрирован на понимании роли этого биохимического события в контроле нормального роста и регуляции трансформированных клеток.

4.4.1. Циклический АМФ

Накоплено значительное число фактов, демонстрирующих ингибирование роста клеток аномально высокими внутриклеточными уровнями цАМФ, продуцируемыми либо добавлением экзогенного цАМФ, либо использованием ингибиторов деградации цАМФ (Friedman et al., 1976). Точка остановки роста находится в G_1-фазе вблизи точки ограничения Pardee (1974). Это привело к широко распространенному выводу, что цАМФ ингибирует клеточный рост, а трансформированные клетки могут утрачивать эту регуляторную функцию, интимно связанную с плазматической мембраной (Pardee et al., 1974). В недавние годы было обнаружено, что роль цАМФ в прогрессировании клеточного цикла более сложная, чем вначале предполагалось. До сих пор существовала истина, что покоящиеся клетки культуры, находящиеся в G_1-подобном состоянии, имеют повышенные внутриклеточные уровни цАМФ, и эти уровни уменьшаются при стимуляции клеточного деления. Сейчас известно, что уровни цАМФ увеличиваются до максимальных сразу же перед входом в S-фазу и это продолжается через клеточный цикл (Costa et al., 1975, 1978). Таким образом, в то время как повышенные уровни цАМФ можно ассоциировать с остановкой роста в ранних фазах клеточного цикла, высокие уровни цАМФ экспрессируются в норме в течение поздних фаз клеточного цикла. Недавняя работа Russel и сотрудников (Byus et al., 1977; Haddox et al., 1980a) предполагает, что аномально высокие уровни цАМФ, встречающиеся в течение остановки роста, просто активируют последовательность форм цАМФ-зависимой протеинкиназы. Их работа также демонстрирует, что экзогенные аналоги цАМФ могут ингибировать рост нормальных и трансформированных клеток сходным образом (Haddox et al., 1980a).

Несколько групп исследователей продемонстрировали на лимфомных мутантных клеточных линиях, что клетки, утрачивающие цАМФ-зависимые протеинкиназы, безучастны к контролю цАМФ

в период проявления их нормальных ростовых свойств (Burne et al., 1975; Insel, Fenno, 1978). Эти результаты, вместе с результатами работ Haddox и других авторов, могут свидетельствовать о разнице в степени ответа трансформированных клеток на действие цАМФ. В зависимости от способа трансформации нормальные цАМФ-зависимые регуляторные механизмы могут быть не задействованы. В других случаях, как, например, в лимфомных мутантных линиях (Burne et al., 1975; Insel, Fenno, 1978), трансформирующая функция может обеспечить механизм для устранения или инактивации нормальных цАМФ-зависимых механизмов фосфорилирования белка. Представляется интригующим предположить по результатам недавних исследований, что трансформирующий продукт вируса саркомы Рауса является протеинкиназой или, по крайней мере, имеет ассоциированную с ней активность (Collett, Erikson, 1978). Исследование трансформированных RSV клеток позволило Haddox и соавт. (1980) предположить, что трансформирующая функция, по-видимому, не влияет на ингибирующие рост эффекты цАМФ и, таким образом, киназная активность трансформирующей функции не замещает и не инактивирует нормальные цАМФ-зависимые механизмы фосфорилирования. Подобных обоснований для клеток, трансформированных другими факторами, нет.

4.4.2. Специфическая экспрессия протеинкиназ

Реакции фосфорилирования и (или) дефосфорилирования являются медиаторами множества клеточных регуляторных сигналов (Tomkins, 1975; Greengard, 1978). Достаточные основания указывали на то, что фосфорилирование гистона H1,— по крайней мере, один аспект механизма (ов), контролирующего клеточную прогрессию из G- в S-фазу (Tobey et al., 1974), возможно, вызывающего структурные изменения в хроматине (Tobey, Hilderbrand, 1977). Фосфорилирование гистонов, что также было установлено, коррелирует с конденсацией / деконденсацией хромосом в то время, когда клетки продвигаются из G_2-фазы в митоз и из митоза в G_1-фазу (Tobey et al., 1974; Tobey, Hilderbrand, 1977). Недавние работы демонстрируют, что протеины (неядерные) также фосфорилируются в течение перехода из фазы в фазу клеточного цикла. Thomas и соавт. (1979) показали, что рибосомальный протеин S6 подвергается множественному фосфорилированию в течение 5 мин после того, как покоящиеся фибробласты 3T3 мышей были стимулированы к пролиферации.

Результаты предыдущих исследований, полученные в нашей лаборатории, продемонстрировали, что в клетках китайских хомячков клеточные пулы растворимых цАМФ-зависимых протеинкиназ увеличивались в то время как синхронизированные клетки проходили через G_1-в S-фазу (Costa et al., 1957). Это увеличение активности и количества энзима коррелировало с изменениями уровня внутриклеточного цАМФ и активацией растворимых цАМФ-зависимых протеинкиназ (Costa et al., 1975). Последовательно мы определили, что специфические формы этих энзимов — тип II — индуцировались в

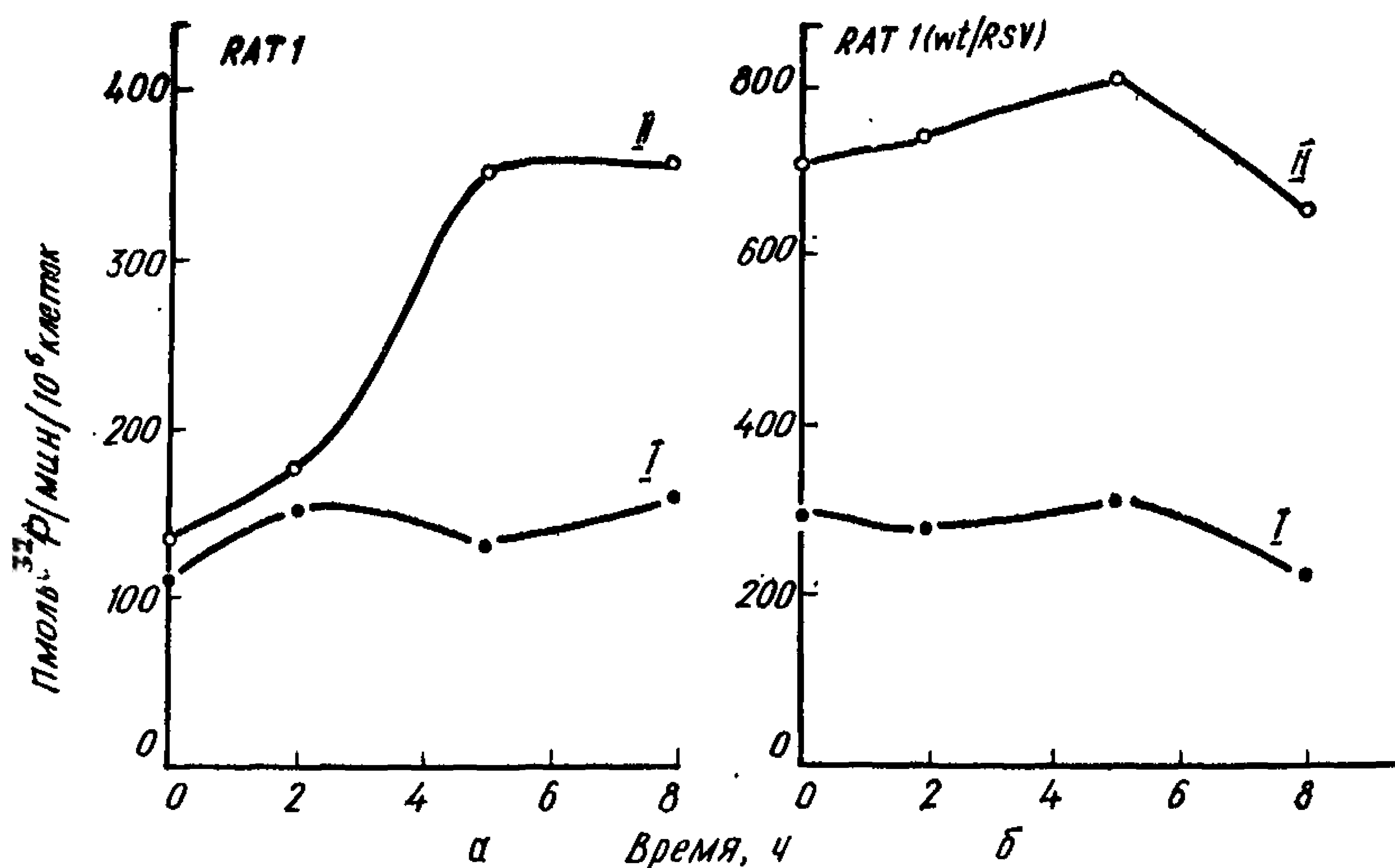


Рис. 5. Тип I и тип II цАМФ-зависимой протеинкиназы в течение G_1 прогрессии нормальных и трансформированных клеток. Покоящиеся клетки Rat1 (*а*) и трансформированные Rat1 клетки (*б*) были стимулированы добавлением свежей, содержащей сыворотку среды. В указанное время клетки экстрагировали и хроматографировали на ДЕАЕ для определения размеров пулов киназы типа I (●) и типа II (○) (из работы Haddox et al., 1980а).

течение перехода из G_1 в S-фазу (Costa et al., 1975), и эта индукция происходила в постоянно циклирующих клетках так же, как и в покоящихся клетках, стимулированных к пролиферации (Costa et al., 1978).

Оригинальная модель Pardee (1974) привела к предположению, что вирусные трансформирующие функции действовали в некоторых точках ограничения в G_1-фазе, чтобы ослабить или модифицировать регуляцию роста, сравнимую с нетрансформированными клетками. В дальнейшем, эта точка совпадала с точкой действия, наблюдаемой для ингибирования роста аномально высокими уровнями экзогенного цАМФ (Pardee, 1974). Byus и соавт. (1977) установили, что ингибирование роста лимфоцитов цАМФ привело в результате к активации последовательности типов цАМФ-зависимых протеинкиназ. Haddox и соавт. (1980а) недавно подтвердили эти данные и продемонстрировали, что это происходит в нормальных и трансформированных вирусом саркомы Рауса клетках Rat1. Было интересно обнаружить, что эти трансформированные фибробласты, обладающие значительно сниженным требованием к сыворотке для роста клеток и репликации ДНК (Magun et al., 1979), имели также повышенные уровни цАМФ-зависимой протеинкиназы типа II (рис. 5). Значения уровня этого энзима в трансформированных клетках, лишенных сыворотки или стимулированных сывороткой, такие же. В лишенных сыворотки трансформированных клетках наблюдались уровни, более чем в 4 раза превышающие уровни в лишенных сыворотки нормаль-

Таблица 2. **Стимулированный дибутирил-цАМФ-синтез типа I и обмен типа II цАМФ-зависимой протеинкиназы в клетках Rat1 и Rat1 (wt/RSV)**

Эксперимент	Синтез цАМФ-зависимых протеинкиназ нмоль/мин/10[6] клеток		
	Тип I	Тип II	Тип I/тип II
Клетки Rat1			
Покоящиеся	102	132	0,77
Сыворотка	134	262	0,52
+ циклогексимид	84	120	0,70
+ актиномицин Д	64	82	0,78
Сыворотка + дибутирил-цАМФ	274	94	2,92
+ циклогексимид	104	30	3,47
+ актиномицин Д	190	24	7,92
Сыворотка + 8-бром-цАМФ	340	92	3,70
Клетки Rat1 (wt/RSV)			
Покоящиеся	300	710	0,42
Сыворотка	225	640	0,35
Сыворотка + дибутирил-цАМФ	415	120	3,45
+ циклогексимид	236	51	4,63
+ актиномицин Д	488	171	2,85
Сыворотка + 8-бром-цАМФ	402	107	3,76

Примечание. 1. Покоящиеся клетки Rat1 и Rat1 (wt/RSV) или клетки, инкубированные в течение 8 ч после добавления свежей, содержащей сыворотку среды в присутствии 1 мМ дибутирил-цАМФ, 8-бром-цАМФ, 25 мкг/мл циклогексимида или 10 Мкг/мл актиномицина Д, были экстрагированы и хроматографированы на ДЕАЕ для определения размеров пула киназы типов I и II. Данные, представленные из работы Haddox и соавт. (1980).

ных культурах, в то время как уровни киназы типа II в нормальных клетках, стимулированных сывороткой, достигают таких же значений в трансформированных клетках. Обнаружены только незначительные различия уровней протеинкиназы типа I нормальных и трансформированных или лишенных сыворотки клеток по сравнению с уровнями энзима стимулированных сывороткой клеток. Табл. 2 (Haddox et al., 1980a) демонстрирует, что эффект дибутирил (Bt_2)-цАФМ одинаков в нормальных и трансформированных RSV фибробластах, в период их действия на экспрессию I и II типов цАМФ-зависимой протеинкиназы. Соотношение типа I к типу II цАМФ-зависимых киназ минимально в пролиферирующих клетках, не зависимых от трансформации. Ингибирование роста клеток в результате лишения сыворотки или действия Bt_2-цАМФ приводит к существенному увеличению этого соотношения, достигая значений, превышающих приблизительно в 10 раз значения нормально пролиферирующих клеток.

Таким образом, в то время как RSV-трансформированные клетки отвечают на сывороточные факторы подобно ингибированию роста аномально высокими уровнями экзогенного цАМФ, регуляторные различия могут существовать на уровне цАМФ-зависимых механизмов. В качестве примера, отмеченного здесь,— трансформированные клетки, которые могут синтезировать существенно более высокие

уровни энзима типа II, специфически экспрессирующегося в пролиферирующих клетках (Costa et al., 1978). Эта экспрессия, вероятно, находящаяся под контролем сывороточных факторов в нормальных, но не трансформированных клетках (Haddox et al., 1980a), может участвовать в возникновении сывороточнозависимых различий клеточной пролиферации, прежде наблюдаемой в этих же нормальных и трансформированных клетках (Magun et al., 1979).

Специфическая экспрессия цАМФ-независимых протеинкиназ может также быть важной регуляторной модификацией, особенно в трансформированных RSV клетках. Продукт src гена RSV недавно был идентифицирован как продукт, имеющий протеинкиназную активность (Collett, Erikson, 1978). Специфические для этой активности субстраты остается выяснить. Описанные данные подтверждают предположение о том, что контроль фосфорилирования протеина может быть важным для понимания различий, присущих трансформации (Pumo et al., 1975).

4.4.3. Орнитиндекарбоксилаза и уровни полиаминов

Увеличение внутриклеточных полиаминов и специфическое увеличение уровня спермидина являются общей характеристикой большинства клеток и тканевых систем, отвечающих на стимул роста (см. Russell, Durie, 1978 для резюме). Орнитиндекарбоксилаза (ОДК) — энзим, лимитирующий скорость биосинтеза полиаминов. Его индукция обычно обнаруживается в течение G_1-фазы клеточного цикла (Russell, Stambrook, 1975; Fuller et al., 1977). Есть основание полагать, что ОДК может индуцироваться с помощью цАМФ-зависимого механизма (Bachbrach, 1975). Временные исследования предполагают, что индукция ОДК происходит до входа клеток в фазу S (Fuller et al., 1977; Haddox et al., 1980b), однако есть также основание считать, что индукция ОДК обычно не происходит вслед за стимуляцией роста (Marks et al., 1979).

Недавние результаты, полученные в нашей лаборатории, демонстрируют, что синхронизированные клетки китайского хомяка могут пересекать G_1-фазу и входить в S-фазу в отсутствие индукции ОДК (Cress, Gerner, 1979). К удивлению, индукция ОДК была ингибирована гидроксимочевиной, которая, как известно, ингибирует рибонуклеотиддифосфат-редуктазу. В работе других указывается, что основной эффект гидроксимочевины в этих клетках китайского хомяка заключался в лимитировании пулов dNTP (Walbers et al., 1973, 1976). Впоследствии мы исключили некоторые возможные действия, с помощью которых гидроксимочевина могла бы ингибировать индукцию ОДК в постоянно циклирующих клетках, и пришли к выводу, что ОДК ингибировалась одним из хорошо понятных механизмов действия гидроксимочевины (Cress, Gerner, 1979, 1980). Они включают ее эффект на метаболизм dNTP и удаление катионов (Moore, 1969). При проведении этих исследований мы также обнаружили, что индукция ОДК в постоянно делящихся клетках может, в действительности, регулироваться по-иному, чем в покоящихся

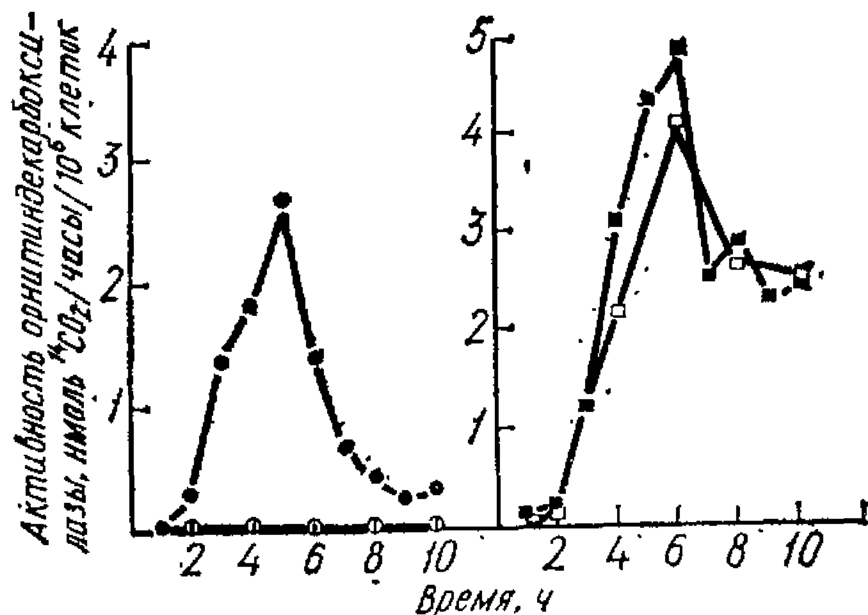


Рис. 6. Индукция ОДК в течение G_1-прогрессии клеток Rat1 (слева) и Rat1 (wt/RSV) (справа). Свежую, содержащую сыворотку среду (● и ■) или только свежую среду (○ и □) добавляли к покоящимся клеткам при 39 °С. В указанное время клетки Rat1 или Rat1 (wt/RSV) собирали, экстрагировали, а в супернатанте оценивали активность ОДК. Данные, изображенные здесь и на других диаграммах и в таблицах, представляют усредненные результаты анализа четырех образцов в каждой точке в эксперименте, который повторялся, по крайней мере, три раза для получения идентичных результатов (из работы Haddox et al., 1980).

клетках, стимулированных к пролиферации (Cress, Gerner, 1980). Эта интерпретация базировалась на данных, что индукция ОДК не ингибировалась гидроксимочевиной в покоящихся клетках, стимулированных к пролиферации, но ингибировалась в непрерывно делящихся клетках.

Haddox и соавт. (1980b) установили, что ОДК может по-разному регулироваться в трансформированных клетках, если сравнивать их с нетрансформированными контролями. Значительные различия обнаружены в клетках Rat1 (wt/RSV) по сравнению с нетрансформированными клетками Rat1. Эти различия включают более высокий уровень активности индуцированной ОДК; невозможность снижения активности ОДК до низкого уровня, в то время как клетки входят в S-фазу (предполагая сниженную скорость деградации энзима); индукцию ОДК, не зависимую от сывороточных факторов в трансформированных клетках. Данные результаты суммированы на рис. 6 (Haddox et al., 1980b). Активность ОДК менее чувствительна к ингибированию путресцином в трансформированных клетках (Haddox et al., 1980b). Эти данные сходны с данными работы нескольких групп исследователей, в которой было продемонстрировано, что индукция ОДК может быть обязательным событием при раке кожи у мышей (O'Brien, 1976; O'Brien et al., 1975; Guspa et al., 1976), и с результатами, полученными Isom, Backstrom (1979), которые показали, что ОДК в отличие от нормы может регулироваться как сывороточными факторами, так и полиаминами в трансформированных клетках.

4.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе мы идентифицировали некоторые различающиеся характеристики трансформированных клеток, которые могут быть ответственными за их измененные свойства роста. Общее свойство трансформированных клеток заключается либо в плохом управлении их покоящимся состоянием, либо в том, что они терпят неудачу при входе в него (клетки, трансформированные ДНК-содержащими опухолеродными вирусами), либо они более легко уходят из него (клетки,

трансформированные РНК-содержащими опухолеродными вирусами или химическими канцерогенами). После того как в результате наблюдений лаборатории Todaro было установлено, что эндогенно секретируемые ростовые факторы могут отвечать за способность некоторых трансформированных клеток ускользать от нормальных, лимитирующих рост контролей, эта область исследований начала активно развиваться. Мы можем спекулировать тем, что большое число ранее нераскрытых ростовых факторов еще будет обнаружено и будет подтверждена их ответственность за автономный рост трансформированных клеток и злокачественных опухолей. Молекулярное действие этих ростовых факторов может, в конечном счете, быть ответственным за изменения таких G_1-ассоциированных событий, как индукция орнитиндекарбоксилазы и экспрессия протеинкиназ. Однако молекулярная основа, с помощью которой ростовые факторы или G_1-ассоциированные клеточные активности связаны с началом репликации ДНК, остается неизвестной.

4.6. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Altman P. L., Katz D. D. (1975). «Cell Biology». Fed. Am. Soc. Exp. Biol., Bethesda, Maryland.

Bachrach U. (1975). Cyclic AMP-mediated induction of ornithine decarboxylase of glioma and neuroblastoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3087—3091.

Bartholomew J. C., Yokota H., Ross P. (1976). Effect of serum on the growth of BALB/3T3 mouse fibroblasts and an SV40-transformed derivative. J. Cell. Physiol., 88, 277—286.

Baserga R. (1971). «The Cell Cycle and Cancer». Dekker, New York.

Bourne H. R., Coffino P., Tomkins G. M. (1975). Somatic genetic analysis of cyclic AMP action : Characterization of unresponsive mutants. J. Cell. Physiol. 85, 611—620.

Brooks R. F. (1976). Regulation of the fibroblast cell cycle by serum. Nature (London) 260, 248—250.

Brooks R. F., Bennett D. C., Smith J. A. (1980). Mammalian cell cycles need two random transitions. Cell 19, 493—504.

Burk R. R. (1970). One-step growth cycle for BHK 21/13 hamster fibroblasts. Exp. Cell Res. 63, 309—316.

Burns F. J., Tannock I. F. (1970). On the existence of a G_0-phase in the cell cycle. Cell Tissue Kinet. 3, 321—334.

Byus C. V., Klimpel G. R., Lucas D. O., Russell D. H. (1977). Type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase as opposite effectors of lymphocyte mitogenesis. Nature (London) 268, 63—64.

Carpenter G., Cohen S. (1976a). Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. J. Cell. Physiol. 88, 227—238.

Carpenter G., Cohen S. (1976b). ^{125}I-labeled human epidermal growth factor—Binding, internalization and degradation in human fibroblasts. J. Cell Biol. 71, 159—171.

Carpenter G., Cohen S. (1978). Epidermal growth factors. In «Biochemical Action of Hormones» (G. Litwack, ed.), 5, pp. 203—244. Academic Press.

Carpenter G., Lembach K. J., Morrison M. M., Cohen S. (1975). Characterization of the binding of ^{125}I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. J. Biol. Chem. 250, 4297—4304.

Clarke G. D., Stoker M. G. P., Ludlow A., Thornton M. (1970). Requirement of serum for DNA synthesis in BHK21 cells: Effects of density, suspension and virus transformation. Nature (London) 227, 298—801.

Cohen S., Carpenter G., Lembach K. J. (1975). Interaction of epidermal growth factor (EGF) with cultured fibroblasts. Adv. Metab. Disord. **8**, 265—284.
Collett M. S., Erikson R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **75**, 2021—2024.
Costa M., Gerner E. W., Russell D. H. (1975). G_1 specific increases in cAMP levels and protein kinase activity in Chinese hamster ovary cells. Biochim. Biophys. Acta **425**, 246—255.
Costa M., Cerner E. W., Russell D. H. (1976). Cell cycle specific activity of type I and type II cAMP-dependent protein kinases in Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. **251**, 3313—3319.
Costa M., Gerner E. W., Russell D. H. (1978). Cyclic AMP levels and types I and II cyclic AMP-dependent protein kinase activity in quiescent cultures stimulated to proliferate. Biochim. Biophys. Acta **538**, 1—10.
Cress A. E., Gerner E. W. (1979). Hydroxyurea inhibits ODC induction, but not the G_1 to S phase transition. Biochem. Biophys. Res. Commun. **87**, 773—780.
Cress A. E., Gerner E. W. (1980). The regulation of ornithine decarboxylase induction in quiescent cells stimulated to proliferate differs from that in continuously dividing cells. Biochem. J. **188**, 375—380.
DeLarco J. E., Todaro G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **75**, 4001—4005.
Drewinko B., Humphrey R. M. (1977). «Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells.» Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
Dubrow R., Riddle V. G. H., Pardee A. B. (1979). Different responses to drugs and serum of cells transformed by various means. Cancer Res. **39**, 2718—2726.
Dulak N. C., Temin H. M. (1973). A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts. J. Cell. Physiol. **81**, 153—160.
Fillingame R. H., Jorstad C. M., Morris D. R. (1975). Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by Concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**, 4042—4045.
Friedman D. L., Johnson R. A., Zeilig C. E. (1976). Adv. Cyclic Nucleotide Res. **7**, 69—111.
Fuller D. J. M., Cerner E. W., Russell D. H. (1977). Polyamine biosynthesis and accumulation during the G_1 to S phase transition. J. Cell. Physiol. **93**, 81—88.
Greengard P. (1978). Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science **199**, 146—152.
Haddox M. K., Magun B. E., Russell D. H. (1980a). Differential expression of type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinase during cell cycle and cyclic AMP-induced growth arrest. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **77**, 3445—3449.
Haddox M. K., Magun B. E., Russell D. H. (1980b). Ornithine decarboxylase induction during G_1 progression of normal and Rous sarcoma virus-transformed cells. Cancer Res. **40**, 604—608.
Heidelberger C. (1977). Chemical carcinogenesis. Cancer (Philadelphia) **40**, 430—433.
Hollenberg M. D., Cuatrecasas P. (1973). Epidermal growth factor: Receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 2964—2968.
Hollenberg M. D., Cuatrecasas P. (1975). Insulin and epidermal growth factor-human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and amino acid uptake. J. Biol. Chem. **250**, 3845—3853.
Holley R. W. (1972). A unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **69**, 2840—2841.
Holley R. W., Kiernan J. A. (1968). Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **60**, 300—304.
Holley R. W., Kiernan J. A. (1971). Studies of serum factors required by 3T3 and SV3T3 cells. Ciba Found. Symp. Growth Control Cell Cult. pp. 3—10.
Holley R. W., Baldwin J. H., Kiernan J. A., Messmer T. O. (1976). Control of growth of benzo (a) pyrene-transformed 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 3229—3232.

Howard A., Pelc S. R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, Suppl. 6, 261—273.

Insel P. A., Fenno J. (1978). Cyclic AMP-dependent protein kinase mediates a cyclic AMP-stimulated decrease in ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 862—865.

Isom H. C., Bakcstrom J. T. (1979). Aberrant regulation of ornithine decarboxylase by serum, putrescine and spermidine in cytomegalovirus-transformed human cells. Cancer Res. 39, 864—869.

Lindgren A., Westermark B. (1977). Reset of the pre-replicative phase of human glia cells in culture. Exp. Cell. Res. 106, 89—93.

Magun B. E., Bowden G. T. (1980). Effects of the tumor promoter TPA on the induction of DNA synthesis in normal and RSV-transformed rat fibroblasts. J. Supramol. Struct. 12, 429—438.

Magun B. E., Thompson R. L., Gerner E. W. (1979). Regulation of DNA replication by serum and the transforming function in cultured rat fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. J. Cell. Physiol. 99, 207—215.

Marks F., Bertsch S., Furstenberger G. (1979). Ornithine decarboxylase activity, cell proliferation and tumor promotion in mouse epidermis in vivo. Cancer Res. 39, 4183—4188.

Martin R. C., Oppenheim A. (1977). Initiation points for DNA replication in nontransformed and simian virus 40-transformed Chinese hamster lung cells. Cell 11, 859—869.

Martin R. G., Stein S. (1976). Resting state in normal and simian virus 40-transformed Chinese hamster lung cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 1655—1659.

Matrisian L. M., and Magun B. E. (1979). Epidermal growth factor binding and induction of DNA synthesis in normal and RSV-transformed Rat-1 cells. J. Cell Biol., 83, 290a.

Moore E. C. (1969). The effects of ferrous ion and dithioerythritol on inhibition by hydroxyurea of ribonucleotide reductase. Cancer Res. 29, 291—295.

Moses H. L., Proper J. A., Volkenant M. E., Wells D. J., Getz M. J. (1978). Mechanism of growth arrest of chemically transformed cells in culture. Cancer Res. 38, 2807—2812.

Nilausen K., and Green H. (1965). Reversible arrest of growth in G_1 of an established fibroblast line (3T3). Exp. Cell Res. 40, 166—168.

O'Brien T. G. (1976). Induction of ornithine decarboxylase as an early, possibly obligatory, event in mouse skin carcinogenesis. Cancer Res. 36, 2644—2653.

O'Brien T. G., Diamond L. (1977). Ornithine decarboxylase induction and DNA synthesis in hamster embryo cell cultures treated with tumor-promoting phorbol diesters. Cancer Res. 37, 3895—3900.

O'Brien T. G., Simsiman R. C., Boutwell R. K. (1975). Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor-promoting agents. Cancer Res. 35, 1662—1670.

O'Neill F. J. (1978). Differential in vitro growth properties of cells transformed by DNA and RNA tumor viruses. Exp. Cell Res.117, 393—401.

Pardee A. B. (1974). A restriction point for the control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1286—1290.

Pardee A. B., Jimenez de Asua L., Rozengurt E. (1974).Functional membrane changes and cell growth : significance and mechanism. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 547—561. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

Paul D. (1973). Quiescent SV40 virus transformed 3T3 cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 745—753.

Paul D, Henahan M., Walter S. (1974). Changes in growth control and growth requirements associated with neoplastic transformation in vitro. J. Natl. Cancer Inst. 53, 1499—1503.

Prescott D. M. (1976). The cell cycle and the control of cellular reproduction. Adv. Genet. 18, 99—177.

Pumo D. E., Stein G. S., Kleinsmith L. J. (1975). Stimulated phosphorylation of non-histone phosphoproteins in SV-40 transformed WI-38 human diploid fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 402, 125—130.

Russell D. H., Durie B. G. M. (1978). «Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth.» Raven, New York.

Russell D. H., Snyder S. H. (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo and various tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 60, 1420—1427.

Russell D. H., Stambrook P. J. (1975). Cell cycle specific fluctuations in adenosine 3′ : 5′-cyclic monophosphate and polyamines in Chinese hamster cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 1482—1486.

Smith J. A., Martin L. (1973). Do cells cycle? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 1263—1267.

Stanbridge E. J., Wilkinson J. (1978). Analysis of malignancy in human cells: Malignant and transformed phenotypes are under separate genetic control. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 1466—1469.

Temin H. M. (1971). Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. J. Cell. Physiol. 78, 161—170.

Thomas G., Siegmann M., Gordon J. (1979). Multiple phosphorylation of ribosomal protein S6 during transition of quiescent 3T3 cells into early G_1, and cellular compartmentalization of the phosphate donor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 3952—3956.

Tobey R. A., Hildebrand C. E. (1977). Cell cycle-related biosynthesis. In «Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells» (B. Drewinko and R. M. Humphrey eds.), pp. 283—293. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

Tobey R. A., Gurley L. R., Hildebrand C. E., Ratliff R. L., Walters R. A. (1974). Sequential biochemical events in preparation for DNA replication and mitosis. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 665—679. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

Todaro G. J., DeLarco J. E. (1976). Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. Nature (London) 264, 26—31.

Todaro G. J., De Larco J. E. (1978). Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. Cancer Res. 38, 4147—4154.

Todaro G. J., Lazar G. K., Green H. (1965). The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. J. Cell. Comp. Physiol. 66, 325—334.

Todaro G. J., DeLarco J. E., Nissley S. P., Rechler M. M. (1977). MSA and EGF receptors on Sarcoma virus transformed cells and human fibrosarcoma cells in culture. Nature (London) 276, 526—528.

Tomkins G. M. (1975). The metabolic code. Science 189, 760—763.

Walters R. A., Tobey R. A., Ratliff R. L. (1973). Cell-cycle-dependent variations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in Chinese hamster cells. Biochim. Biophys. Acta 319, 336—347.

Walters R. A., Tobey R. A., Hildebrand C. E. (1976). Hydroxyurea does not prevent synchronized G_1 Chinese hamster cells from entering the DNA synthetic period. Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 212—217.

Yen A., Pardee A. B. (1979). Role of nuclear size in cell growth initiation. Science 204, 1315—1317.

Yuspa S. H., Lichti U., Ben T., Patterson E., Hennings H., Slaga T. J., Colburn H., Kelsey W. (1976). Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures. Nature (London) 262, 402—404.

5

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ЕЕ СВЯЗЬ С ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ ОБМЕНОМ

Чарлз Е. Уэннер и Л. Дэвид Томеи

5.1. Введение 158
5.2. Контроль аэробного гликолиза с помощью утилизации энергии . . . 159
5.2.1. АТФазы и аэробный гликолиз 159
5.2.2. Фосфофруктокиназа — ключевой энзим в метаболическом контроле гликолиза 160
5.2.3. Изменения транспорта сахаров, связанные с малигнизацией . . . 161
5.3. Клеточная трансформация и фенотипическая экспрессия энергетического обмена 163
5.3.1. Реверсия к нормальному фенотипу клеток, трансформированных температурочувствительным мутантом вируса саркомы мышей . . . 163
5.3.2. Реверсия злокачественного фенотипа при изменении окружающей среды 165
5.4. Заключение, выводы и дальнейшие направления исследований энергетического обмена при неоплазии 171
5.5. Указатель литературы 172

5.1. ВВЕДЕНИЕ

Особенности энергетического обмена опухолевых клеток впервые наблюдал Warburg с помощью своего пионерского манометрического метода (Warburg, 1930). В прогрессивно растущих злокачественных клетках наблюдается высокий уровень гликолиза (аэробного и анаэробного), хотя признается, что гликолиз не является неотъемлемым признаком неоплазм, и в клетках некоторых опухолей, например гепатом с минимальным отклонением, наблюдается довольно низкий уровень аэробного гликолиза (Weinhouse, 1972; Wenner, 1975). До сих пор нет единства в объяснении механизма, работающего на повышение интенсивности гликолиза в экспериментальных злокачественных опухолях (Pedersen, 1978), поэтому первая часть этой главы посвящена обсуждению возможных механизмов повышенного уровня аэробного гликолиза в трансформированных клетках.

Возникает вопрос, является ли повышенный уровень аэробного гликолиза неотъемлемым свойством опухолевых клеток и в какой

степени сила проявления фенотипа злокачественной трансформации в плане энергетического состояния обусловлена окружающей средой. Во второй части этой главы рассматриваются последние исследования, предполагающие, что экспрессия метаболических характеристик злокачественного фенотипа существенно связана с присутствием внеклеточных компонентов в синтетической среде.

5.2. КОНТРОЛЬ АЭРОБНОГО ГЛИКОЛИЗА С ПОМОЩЬЮ УТИЛИЗАЦИИ ЭНЕРГИИ

Роль использования энергии и кофакторов системы фосфорилирования в регуляции гликолиза признавалась в течение некоторого времени (Chance et al., 1965). Racker и сотрудники установили, что ингибиторы клеточной АТФазы могут снижать скорость образования лактата в опухолевых клетках до уровня, наблюдаемого в нормальных клетках. Эти данные были интерпретированы так, что АТФазы являются прямой причиной высокого уровня гликолиза в исследованных клетках. Однако другие исследователи отметили в трансформированных клетках усиление транспорта гексозы и гликолитических ферментов, таких, как гексокиназа и фосфофруктокиназа, и расценили это явление как первопричину повышенного гликолиза в опухолевых клетках. В этом историческом введении дан обзор факторов, участвующих в повышении уровня гликолиза в опухолевых клетках.

5.2.1. АТФазы и аэробный гликолиз

Racker (1976) предположил, что высокий уровень аэробного гликолиза опухолевых клеток обусловлен активацией бактериальных, вирусных или находящихся в плазматической мембране АТФаз. Как видно из исследований Racker и сотрудников, проведенных с использованием таких ингибиторов, как рутамицин, угнетающий митохондриальную АТФазу, и оубаин, угнетающий АТФазу плазматической мембраны, опухоли сильно различаются их ответом на действие разных ингибиторов. Например, гликолиз в клетках 3Т3 нетрансформированных и трансформированных вирусом полиомы, в большой степени подавлялся рутамицином, что предполагает в этих клетках поддержание гликолиза митохондриальной АТФазой. Однако в клетках L1210 выраженный ингибирующий эффект на гликолиз оказывал не рутамицин, а оубаин. Таким образом, высокий уровень аэробного гликолиза может быть обусловлен различными факторами, зависящими от типа использованной экспериментальной опухоли.

Вероятно, в быстро растущих опухолевых клетках повышенный уровень гликолиза может быть связан с потребностями в энергии, затрачиваемой на биосинтетические процессы, однако эти потребности малы по сравнению с таковыми, необходимыми, например, для ионного транспорта. Это положение подтверждается наблюдением Fagan и Racker (1978), показавших, что ингибиторы синтеза белков

Таблица 1. **Влияние времени культивирования на гликолиз в клетках C3H-10T 1/2 в присутствии и отсутствие оубаина**

Время после посева, дни	Число клеток в чашке, $\times 10^5$	Оубаин			
		−	+	−	+
		(^{14}C)-лактат, нмоль/чашка/30 мин		(^{14}C)-лактат/10^6 клеток/30 мин	
3	1,1	254	167	231	152 (0,658)[1]
6	4,1	126	103	31	25,7 (0,83)
10	5,5	91	66	16,5	12,0 (0,73)
17	6,6	134	120	20,3	18,2 (0,89)

[1] Цифры в скобках представляют отношение: обработанные оубаином клетки/контроль. Клетки инкубировались, как показано на рис. 1.

и нуклеиновых кислот существенно не влияют на интенсивность гликолиза.

При более подробном анализе ранних исследований культивируемых клеток можно заметить, что во многих случаях условия культивирования были недостаточно установлены. Поскольку они могут влиять на наблюдаемый ответ, необходимо точно их определить (например, время последнего обновления среды, плотность посева и т. п.), чтобы получить сопоставимые результаты. Так, мы наблюдали, что уровень гликолиза в клетках C3H-10T понижается после логарифмической фазы роста (табл. 1). Далее, O'Brien и соавт. (1979) сообщили, что концентрация лактата в среде постоянно уменьшается после того, как клетки мышей BALB/c 3T3 достигают состояния сплошного монослоя. Когда опыты проводились в четко установленные промежутки времени, также были обнаружены различия чувствительности к ингибиторам, таким, как оубаин.

В опытах Carroll и соавт. (1978) угнетение оубаином аэробного гликолиза клеток NRK в одной серии опытов было незначительным, в то время как в другой серии опытов с клетками того же типа наблюдалось угнетение продукции лактата примерно на 40 %. Мы также наблюдали цикличность угнетения оубаином поглощения $^{86}Rb^{+}$ клетками 3T3, которая зависела от времени взятия образцов в течение логарифмической фазы роста культур (Moroney et al., 1978).

5.2.2. Фосфофруктокиназа — ключевой энзим в метаболическом контроле гликолиза

Исследование нарушений равновесия интермедиатов гликолиза указало на фосфофруктокиназу как фактор, лимитирующий интенсивность аэробного гликолиза. Rozengurt и соавт. (1977) измеряли активность фосфофруктокиназы клеток 3T3 до и после трансформации вирусом SV40 или вирусом полиомы. Они обнаружили, что индуцированный вирусом высокий уровень продукции лактата продолжался после гомогенизации клеток и различие трансформированных вирусом клеток и их гомогенатов по сравнению с нормальными выра-

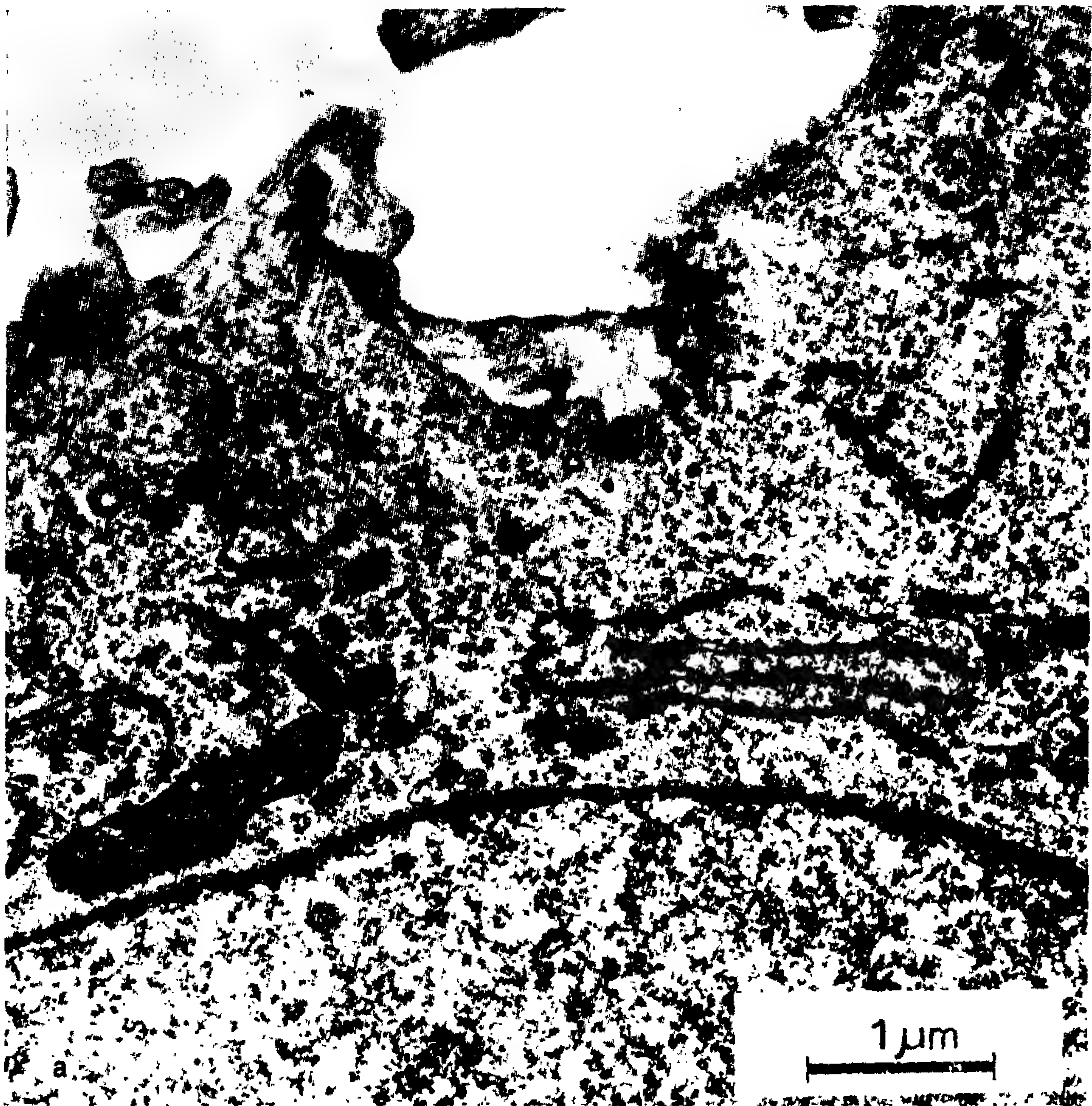
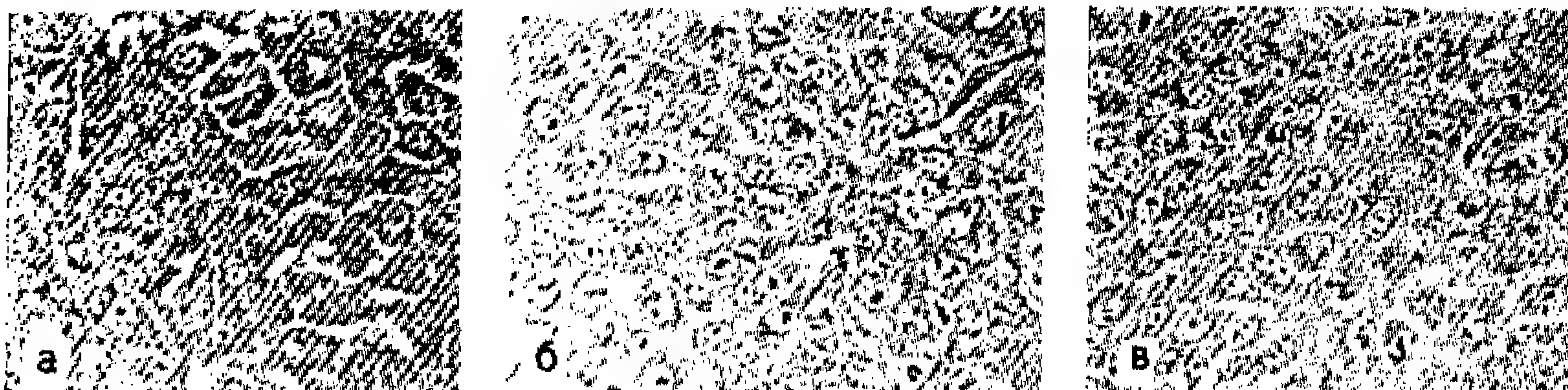


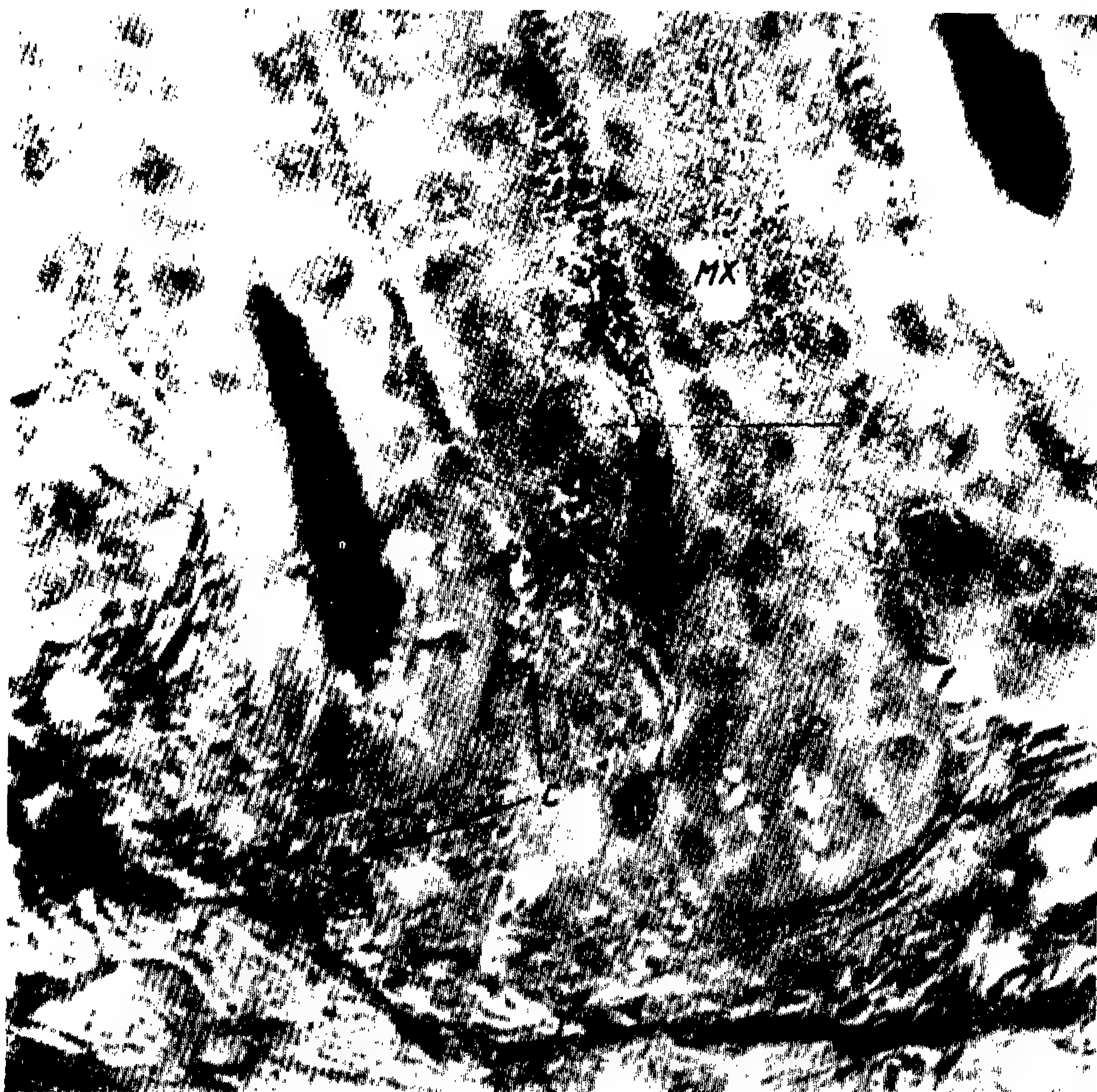
Рис. 2. Ультраструктурные характеристики клеток крысиной С6 глиомы перед (а) и после (б) трехчасовой обработки 20 мМ глюкозамина. В обработанных клетках наблюдается фрагментация эндоплазматического ретикулума, выпячивания наружной мембраны ядер и митохондрий, увеличение вазикул и комплекса Гольджи, а также снижение содержания полисом. × 21318. Репродукция из Friedman, Skehan (1980).

К ГЛАВЕ 9



Микрофотографии эпителиальных клеток молочной железы мышей в первичных культурах: *а* — нормальной ткани; *б* — предопухолевых узлов, HAN; *в* — опухоли. Фазовый контраст, × 40.

К ГЛАВЕ 12



Изображение лиофилизированного нефиксированного среза двенадцатиперстной кишки мышей. Внизу микрофото показаны мышечные волокна (*M*). Видны гранулы клеток Панета (*P*), соединительнотканые элементы собственно мембраны (*C*) и митотический хроматин (*MX*) делящихся энтероцитов.

жалось повышением активности фосфофруктокиназы. Эти авторы предположили, что высокий уровень образования лактата в большей степени обусловлен нарушением гликолиза, чем нарушением транспорта глюкозы. При трансформации могут возникать нарушения транспорта сахаров, однако это само по себе не может быть причиной повышенного образования лактата, так как последнее сохраняется в бесклеточных гомогенатах. Подкреплением предположения, что транспорт гексоз не ограничивает гликолиз, являются данные Christopher и соавт. (1978), показывающие, что в нормальных и трансформированных эмбриональных куриных фибробластах концентрация внутриклеточной глюкозы выше, чем глюкозо-6-фосфата и гексокиназы.

Исследования Singh и соавт. (1974, 1976) показали, что активность гексокиназы и фосфофруктокиназы не является ограничивающим фактором для гликолиза: активность этих ферментов гораздо выше, чем исходный уровень гликолиза в нормальных и трансформированных клетках. Эти изменения могут быть адаптивными и возникать в результате ускорения начальных реакций, протекающих с использованием энергии, как это предположили Fagan и Racker (1978). Несомненно, преимущество таких адаптивных изменений заключается в том, что они, вероятно, обеспечивают с помощью аллостерической регуляции ферментов бо́льшую приспособляемость клетки к ее изменяющимся потребностям в АТФ при трансформации.

5.2.3. Изменения транспорта сахаров, связанные с малигнизацией

Вирусная трансформация клеток животных в культуре вызывает рост числа молекул, обладающих транспортной активностью, особенно сахаров, в связи с чем Holley (1975) и Pardee (1974) предположили, что эти изменения транспорта являются первостепенными для освобождения злокачественных клеток от контроля роста.

Многочисленные сообщения о том, что в клетках, трансформированных вирусом, повышается поглощение глюкозы, были объяснены повышенным транспортом сахара (Kletzien, Perdue, 1974; Hatanaka, 1974). В этих работах показано, что транспорт глюкозы и ее аналогов — 2-дезоксиглюкозы и 3-О-метилглюкозы повышается в 3—4 раза в клетках с морфологическими изменениями, характерными для вирусной трансформации, или в 2 раза — для температурочувствительного мутанта вируса саркомы Payca TS-68. Вычисление констант кинетики транспорта глюкозы по диаграммам Лайнуивера — Бэрка показало, что V_{max} была более чем в 2 раза выше при пермиссивной температуре, а K_M не изменялась, что согласуется с интерпретацией, объясняющей повышенный транспорт за счет увеличения числа транспортных сайтов.

Сообщение о том, что повышенное поглощение сахара клетками мышей, трансформированными ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, можно объяснить повышением фосфорилирования (Romano, Colby, 1973), оспаривалось Kletzien и Perdue (1974). Вероятно,

интерпретация Romano и Colby может быть также объяснена изменениями транспортного механизма. Romano и Colby неправильно расценили быстрое появление свободной 2-дезоксиглюкозы в клетке как показатель скорости транспорта и предположили, что, поскольку «равновесная концентрация» внутриклеточной свободной 2-дезоксиглюкозы была одинаковой в неинфицированных и трансформированных клетках, различия в поглощении сахара были обусловлены уровнем фосфорилирования. Однако кинетика зависит от исходного уровня, а не от «равновесных концентраций» (Cletzien, Perdue, 1974).

В культивируемых куриных эмбриональных фибробластах под влиянием таких веществ, как фенол и грамицидин, наступают изменения гликолиза, сходные с изменениями, индуцированными вирусной трансформацией (Fagan, Racker, 1978). K_M гликолиза для глюкозы уменьшался примерно в 10 раз, а V_{max} транспорта гексоз повышалась в 4 раза. Эти наблюдения показывают, что скорость утилизации клеточной энергии оказывает регулярное влияние на транспорт гексоз. До сих пор не ясен механизм, с помощью которого энергетический статус мог бы контролировать транспорт гексоз.

Недавно в одной из работ сравнивалась глюкозосвязывающая фракция, выделенная из культур нормальных куриных фибробластов, с фракцией, выделенной из куриных фибробластов, трансформированных вирусом саркомы Рауса (Lee, Lipmann, 1977). Значение экстрагированного связывающего фактора при определении было примерно в 2,5 раза выше в трансформированных клетках по сравнению с нормальными фибробластами, а значение поглощения глюкозы было выше в трансформированных клетках, чем в нормальных. Также было показано, что добавление хроматографически выделенного транспортного белка стимулировало транспорт в нормальных клетках, а не трансформированных (Lipmann, Lee, 1978). В клетках, растущих при низких концентрациях глюкозы или фруктозы, фактор стимулировал поглощение глюкозы в 7—10 раз, а в некоторых случаях — до уровня трансформированных клеток. Кроме того, добавление транспортного белка индуцировало формирование (^{14}C)-дезоксиглюкозо-6-фосфата в такой же степени, в какой оно стимулировало транспорт (^{14}C)-дезоксиглюкозы. Этот очищенный связывающий белок представлял собой фракцию с молекулярной массой 73 000 Д с примесью предполагаемых его мономеров (18 000 Д).

Мажорный гликопротеин, выделенный из вируса миелобластоза птиц, также оказывал сходный стимулирующий эффект на транспорт глюкозы и гликолиз в нормальных фибробластах, но в клетках, трансформированных RSV, наблюдался слабый ответ (Papamatheakis, Marciani, 1979). Кроме того, в покоящихся нормальных фибробластах, стимулированных насыщающим количеством сыворотки, отмечено дальнейшее угнетение 2-дезоксиглюкозы при обработке этим вирусным белком. В результате этих наблюдений предполагают, что гликопротеин может действовать на систему, являющуюся одновременно мишенью для действия сывороточных факторов.

5.3. КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

5.3.1. Реверсия к нормальному фенотипу клеток, трансформированных температурочувствительным мутантом вируса саркомы мышей

Недавно проведенные исследования температурочувствительных мутантов позволили сделать прямое сравнение нормальных и трансформированных фенотипов одних и тех же инфицированных клеток. В исследованиях Singer и соавт. (в частности, Ash et al., 1976; Carroll et al., 1978) определены свойства, характерные для клеток, трансформированных в результате использования температурочувствительного мутанта вируса саркомы Рауса, где возникает меньше вариантов, связанных с проблемами селекции клеток. Изученные трансформированные клетки имели следующие свойства: усиленный гликолиз, беспорядочное распределение внутриклеточных гладкомышечных миозиноподобных молекул, способность в этих клетках поверхностных молекул — рецепторов для КонА — формировать кластеры при обработке КонА. При изучении таких температурочувствительных мутантов наблюдали, что определенные структурные характеристики трансформированного фенотипа могут быть обратимы при введении ингибиторов синтеза белков в клетки, растущие при пермиссивной температуре.

Carroll и соавт. (1978) поставили вопрос, является ли реверсивность нормального фенотипа при угнетении белкового синтеза в этих клетках плейотипной и может ли она быть истинной не только для структурных, но и для обменных характеристик. В качестве показателя состояния метаболизма клетки они избрали аэробный гликолиз. Было обнаружено, что в инфицированных клетках при пермиссивной температуре уровень гликолиза повышается, что характерно для трансформированного статуса. Кроме того, было показано, что введение ингибиторов белкового синтеза, таких, как абрин или циклогексимид, оказывало обратный эффект на уровень гликолиза, наблюдаемого при непермиссивной температуре. Таким образом, реверсия от трансформированного к нормальному фенотипу была показана не только на морфологии клетки, структуре внутриклеточных миозиновых нитей и подвижности рецепторов КонА, но также на аэробном гликолизе. Таким образом, можно заключить, что реверсия от трансформированного к нормальному фенотипу, индуцированная ингибитором белкового синтеза, является плейотипной, т. е. вовлекает более чем один структурный и метаболический параметр.

Эти исследования также предполагают, что один белок — продукт гена src — может индуцировать физиологическое состояние, отличающееся от состояния нормальной клетки. Это интересно с точки зрения наблюдений, что стационарная фаза поддерживается большим числом регуляторных механизмов. Если, как предполагалось, в эту регуляцию вовлечена протеинкиназа (Carroll et al., 1978), то этот белок может быть пусковым фактором нового состоя-

ния, при котором усиленный аэробный гликолиз — одно из многих нарушенных свойств.

Предполагается, что протеинкиназа не зависит от циклического АМФ (Erikson et al., 1979), и это, несомненно, представляет большой интерес. Как показано Singer и соавт. (1975), Carroll и соавт. (1978), если протеинкиназа относительно не специфична к белковым субстратам, плейотипическая реверсивность клеточных процессов может быть связана с фосфорилированием, индуцированным в большом числе клеточных белков. Читатель может обратить внимание на приведенную здесь характеристику злокачественной трансформации, которая предполагает, что злокачественная клетка регулирует свои собственные функции. Однако, если исследуется гетерогенная клеточная популяция — состояние, более соответствующее условиям в тканях и органах тела, появляется другое мнение. В опытах Sivak и Van Duuren (1970) нормальные клетки 3T3 в виде покоящихся монослойных культур были способны подавлять рост дериватов, трансформированных SV40. Таким образом, рост злокачественно трансформированных клеток, по крайней мере, частично контролируется окружающими нормальными клетками. До сих пор не известно, в какой степени клеточно — клеточные взаимодействия регулируют биохимические процессы в клетке и могут ли нормальные клетки, контактирующие с трансформированной клеткой (например, инфицированной температурочувствительным мутантом при пермиссивной температуре), подавлять не только пролиферацию, но также усиленный аэробный гликолиз. Такие рассуждения подчеркивают многоплановую природу трансформации и несостоятельность унифицирующих концепций.

Для выяснения роли клеточноповерхностных взаимодействий мы изучали реверсию злокачественного фенотипа при изменении окружающей среды. Наша точка зрения заключается в том, что изменения окружающей среды могут приводить к экспрессии процессов, индуцированных взаимодействиями на клеточной поверхности (сравни также Schwarz et al., 1978). Недавно было показано, что определенная степень контроля роста может быть восстановлена в злокачественно трансформированных фибробластах мышей при размножении клеток в химически определенной среде. Фенотип клеток, растущих в среде определенного химического состава, был резко измененным. В частности, была изменена морфология клеток, нарушен клеточный контакт, угнетена пролиферация клеток, зависящая от плотности роста (Tomei, Bertram, 1978). Эта система дает возможность исследовать, снижается ли повышенный уровень аэробного гликолиза, типичный для трансформированных клеток, при их росте в химически определенной среде и могут ли при этом осуществляться биологические процессы дифференцировки (такие, как жировая конверсия), типичные для нормального фенотипа. Если это подтвердится, то могут ли на реверсию злокачественного фенотипа в таком случае влиять условия окружения, изменяющие экспрессию метаболических параметров?

5.3.2. Реверсия злокачественного фенотипа при изменении окружающей среды

5.3.2.1. Особенности морфологии, адгезивных свойств и липидного обмена клеток при изменении окружающей среды

Показано, что культура клеток C3H-10T1/2 представляет собой ценный объект для изучения регуляции роста и дифференцировки in vitro (Bertram, 1979; Taylor, Jones, 1979). На рис. 1 (см. вклейку) показаны значительные нарушения роста морфологии в результате злокачественной трансформации, индуцированной 3-метилхолантреном. На микрофотографии представлено распространение периферической части трансформированного фокуса в монослой покоящихся клеток 10T1/2 при исследовании с помощью хоффманновской модулированной контрастной микроскопии. Сходный фокус был ранее выделен и клонирован Reznikoff и соавт. (1973) и проведен приблизительно через 64 серийных пассажа в среде с добавлением сыворотки. Когда трансформированные клетки T10T1/2 размножались в среде, лишенной липидов и сывороточных белков, их свойства несколько изменялись в течение 36—48 ч. Восстанавливалась субстратная зависимость роста клеток (рис. 2, см. вклейку) и их морфология. При исследовании с помощью светового микроскопа клетки имели более уплощенную форму, отсутствовало их перекрывание. Культуры, получаемые из предварительно обработанных альбумином трипсинизированных клеточных суспензий, не имели какой-либо организации или ориентировки (рис. 3, вверху, вклейка), в то время как механически разделенные клетки имели отличающуюся веретенообразную форму с осевой ориентировкой (Tomei, Bertram, 1978). Когда эти клетки возвращали в среду, содержащую сыворотку (рис. 3, внизу, вклейка), их ростовые свойства вновь становились характерными для трансформированного состояния.

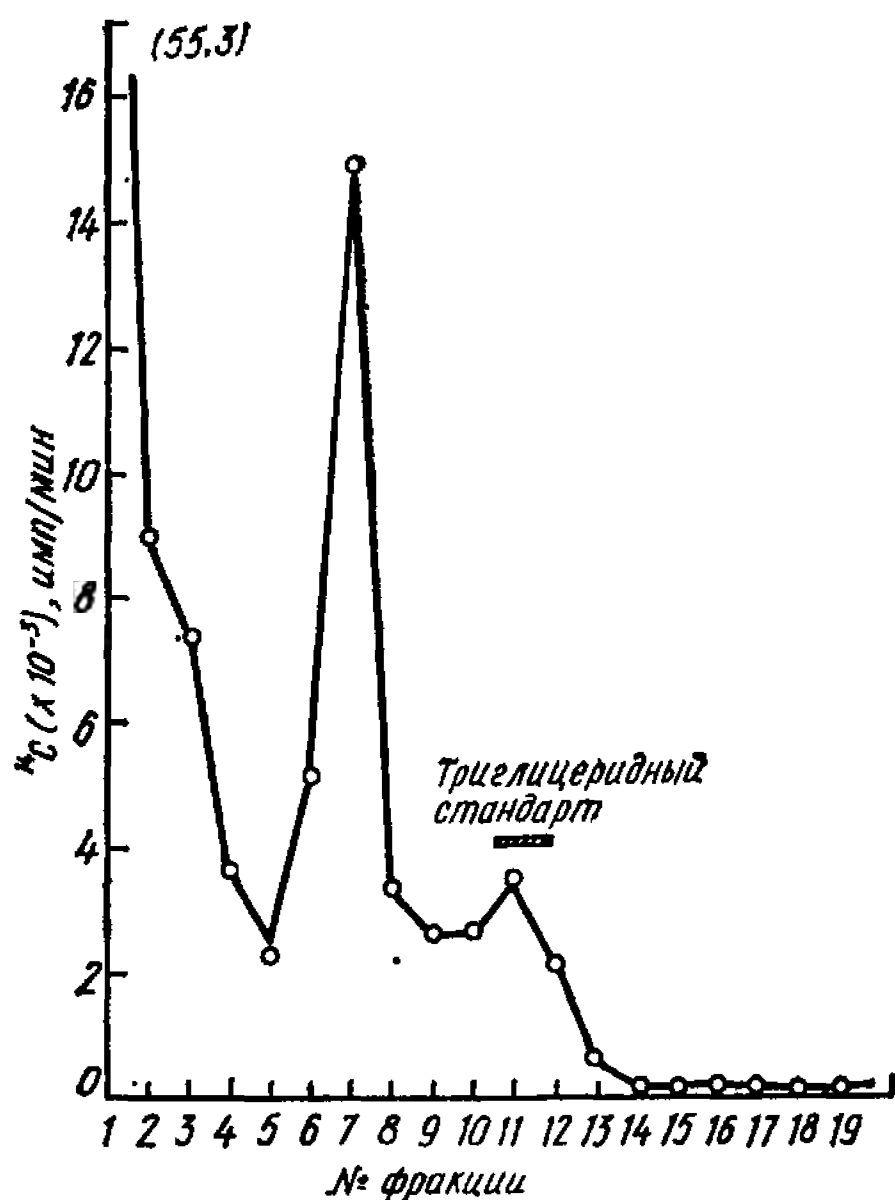
Контактное торможение роста, вероятно, является функцией субстратной (адгезивной) зависимости, а также клеточно — клеточного взаимодействия. Общее свойство субстратной зависимости утрачивалось после добавления 50—1000 мкг/мл альбумина или 10—20 мкг/мл трипсина (рис. 4; см. вклейку). Предполагали, что оба метода обработки эффективно модифицируют взаимодействия клеточной поверхности и субстрата, хотя клеточно — клеточное взаимодействие, вероятно, также нарушалось. Клетки не были способны к движению, как это наблюдалось в присутствии сыворотки. Поведение такой клеточной популяции четко и резко изменялось в безбелковой среде, но сходство с нетрансформированными родительскими клетками ограничивалось адгезивной зависимостью и правильной морфологией. Способность к движению не восстанавливалась, не была обнаружена также тенденция клеток перекрываться или подползать под соседние клетки, наблюдаемая в культурах трансформированных и нетрансформированных клеток 10T 1/2 в присутствии сыворотки (Bell, 1977).

Другое свойство, наблюдаемое в культивируемых клетках 10T 1/2, в сбалансированной среде, указывающее на более нормаль-

ный фенотип,— это развитие в них больших перинуклеарных телец с последующим округлением и выделением отдельных клеток с поверхности. Фиксированные 10 %-ным формалином или 2,5 %-ным глютаральдегидом и окрашенные масляным красным О культивируемые клетки микроскопически имели признаки жировой конверсии (рис. 5, вверху, вклейка), совершенно сходной с конверсией, наблюдаемой в фибробластах линии 3Т3 мышей (Green, Meuth, 1974; Green, Kehinde, 1975) (рис. 6, см. вклейку). При культивировании в присутствии низких концентраций сыворотки (2,5 %) клетки возвращались к типичному неконтролируемому росту, хотя в цитоплазме отдельных клеток наблюдалось накопление жировых телец (рис. 5, внизу, вклейка). Нейтральные липиды экстрагировали из клеток in situ в чашках Петри (диаметром 60 мм) с использованием смеси изопропанол : гептан (0,73 : 0,27) и разделялись с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле в смеси петролейный эфир : этиловый эфир : уксусная кислота (80 : 30 : 1). Как видно на рис. 7 (см. вклейку), в полученных гелях, окрашенных I_2, обнаружено присутствие нескольких фракций со значениями R_f от 0,03 до 0,25 и двух мажорных фракций со значениями 0,76 и 0,87 для культур клеток с добавлением (без конверсии) и без добавления (90 % + конверсия) сыворотки (5 %). Вероятно, что фракции 0,3—0,25 и 0,87 представляют собой глицериловые эфиры, содержание которых повышено в некоторых линиях культивируемых клеток (Wood, 1973). Одна фракция определялась только в культурах с гистологически определяемой жировой конверсией, и эта фракция комигрировала с триглицеридными стандартами при значениях R_f0,63—0,65.

Кривая включения (^{14}C)-ацетата в нейтральные липиды в культурах с гистологической конверсией имела пик при 124 пмоль (^{14}C)-ацетата/10^6 клеток/час. Хроматографическое разделение нейтральных липидов показало, что ^{14}C включался в две раздельно мигрирующие фракции со значениями R_f0,35 и 0,55—0,60. Последняя фракция мигрировала с триглицеридным стандартом и окрашивалась масляным красным О (рис. 8). Возможно, что ацетат использовался в синтезе свободных жирных кислот (СЖК), алкилглицерилэфиров и триглицеридов, которые аккумулировались в запасных каплях в цитоплазме. По-видимому, это нельзя объяснить «жировой дегенерацией» этих клеток (см. Moskovitz, 1967, где даются пространные рассуждения о концепции жировой дегенерации in vitro). Следовательно, важно определить, сходно ли это накопление липидов с дифференцировкой адипоцитов или с простым цитоплазматическим накоплением липидов, источником которых, возможно, являются дегенерировавшие клетки в культурах. Последнее наблюдается нередко и часто приводит к характерным морфологическим изменениям, не отличимым от жировой конверсии клеток 3Т3, но этот процесс всегда обратим. Tomei и Wenner (1978) сообщали о таких наблюдениях в следующем плане: 1) клетки, в которых началось накопление липидов, не вступали в митоз и не были способны к субкультивированию; 2) липиды синтезировались de novo из (^{14}C) -ацетата и появлялись во фракциях, комигрировавших с жирными

Рис. 8. Изучение распределения ^{14}C в культурах клеток СД-Т-10Т 1/2, обработанных (^{14}C)-ацетатом в течение 20 ч с помощью тонкослойной хроматографии. На 7—10-й день в культуры добавлялся 1 мкКи ацетата (43 Ки/моль), через 20 ч культуры промывались и фиксировались формалином. Липиды экстрагировались смесью метанол : хлороформ : вода (2 : 1 : 0,8) (Kates, 1972) и хроматографировались на силикагеле, как описано на рис. 7. Триглицеридный стандарт (оливковое масло) определялся с помощью окрашивания в парах J_2. ^{14}C определялся в сегментах 1 см, в результате чего выявлены два основных пика при значениях R_f 0,35 и 0,58 (0,55—0,60). Только фракция при 0,58 окрашивалась масляным красным О.



кислотами и триглицеридами; 3) фракции нейтральных липидов, комигрировавшие с триглицеридами, появлялись только в культуре клеток с гистологической конверсией и отсутствовали, когда конверсия не наблюдалась.

Bailey (1967) сообщил результаты исследования поглощения сывороточных липидов L-клетками: несмотря на то что экзогенные триглицериды легко инкорпорируются в клетки, жирные кислоты сывороточного происхождения представляют собой в клетке небольшую фракцию по сравнению с общей. Маловероятно, что в отсутствие альбумина значительное количество СЖК становится доступным для клеток. При жировой конверсии определенную роль может играть поглощение из среды триглицеридов разрушенных клеток. Поскольку в культуру не вводились экзогенные липиды, можно предположить, что аккумулируемые триглицериды — продукт синтеза de novo.

В биологическом плане это явление представляет собой несколько высокоорганизованных и сложных клеточных обменных процессов, эффективно нарушающих функцию сохранения жиров клеткой. Хотя жиросодержащие клетки остаются жизнеспособными после пассажа культуры в течение 7 и более дней, эти клетки не способны к последующему делению вне зависимости от присутствия сыворотки, что свидетельствует об окончательной дифференцировке. Заманчиво предположить, что это является в конечном счете последствием нарушения процессов, связанных с клеточной поверхностью. Вероятно, что взаимодействие клеток и адгезивного субстрата на уровне плазматической мембраны облегчается при отсутствии экзогенного белка, адсорбированного на поверхности. Значительная модифика-

ция адгезивных процессов была связана с адсорбированными клеточными белками или кристаллинальбумином (Grinnell, 1974), и вполне вероятно, что подобный механизм функционирует здесь также. Модуляция клеточноповерхностных взаимодействий рассматривается, таким образом, как первичный фактор в регуляции генной экспрессии (сравни Robbins, Nicholson, 1975; Singer, 1975), в данном случае — дифференцировки адипоцитов. Taylor и Jones (1979) недавно сообщили, что в параллельных опытах нетрансформированные клетки C3H-10T 1/2 могут быть индуцированы к формированию адипоцитов, а также миоцитов и хондроцитов после обработки 5-азацитидином. 5-Азацитидин также индуцировал формирование мышечных клеток из злокачественно трансформированных клеток C3H-10T 1/2 CL8, хотя и не в такой степени, как из нормальных клеток 10T 1/2. Это подтверждает предположение, что трансформированные дериваты могут все еще сохранять генетическую информацию, необходимую для дифференцировки.

С другой стороны, в адипоцитарной конверсии отсутствовал один аспект фенотипической реверсии. Некоторые исследователи (Green, Meuth, 1974; Taylor, Jones, 1979) сообщали, что адипоцитная конверсия клеток проходит с формированием фокусов (см. рис. 5 и 6). Конверсия клеток T-10T 1/2 к гистологически идентичному адипоциту проходит случайно, без развития фокусов. Поскольку развитие фокусов явно не клонального происхождения, логично объяснить это свойство как отражение клеточно — клеточных взаимодействий. По отношению к адгезионной зависимости и контактному торможению роста наличие жировой конверсии согласуется с невозможностью восстановления нормальных клеточно — клеточных взаимодействий.

5.3.2.2. Изменения энергетического обмена в среде определенного химического состава

Tomei и Bertram (1978) установили, что фенотип трансформированных метилхолантреном клеток C3H-10T 1/2 CL8 конвертирован к правильной эпителиоидной морфологии без перекрывания клеток и развитию способности формировать сплошной монослой непролиферирующих клеток с плотностью насыщения 5×10^4 клеток /см^2 при росте в среде FCRC-20. Далее они обнаружили, что, когда клетки, растущие в сбалансированной среде, переносятся в основную среду Игла (ОСИ) с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки, инактивированной нагреванием, они вновь приобретают трансформированный фенотип с сохранением их туморогенности. Эти исследования показывают, что экспрессия трансформированного фенотипа может зависеть от условий окружающей среды, и таким образом можно изучить, вовлекает ли реверсия усиленный аэробный гликолиз и обратимы ли сами процессы реверсии, как это наблюдали Carroll и др. (1978) при использовании ингибиторов белкового синтеза.

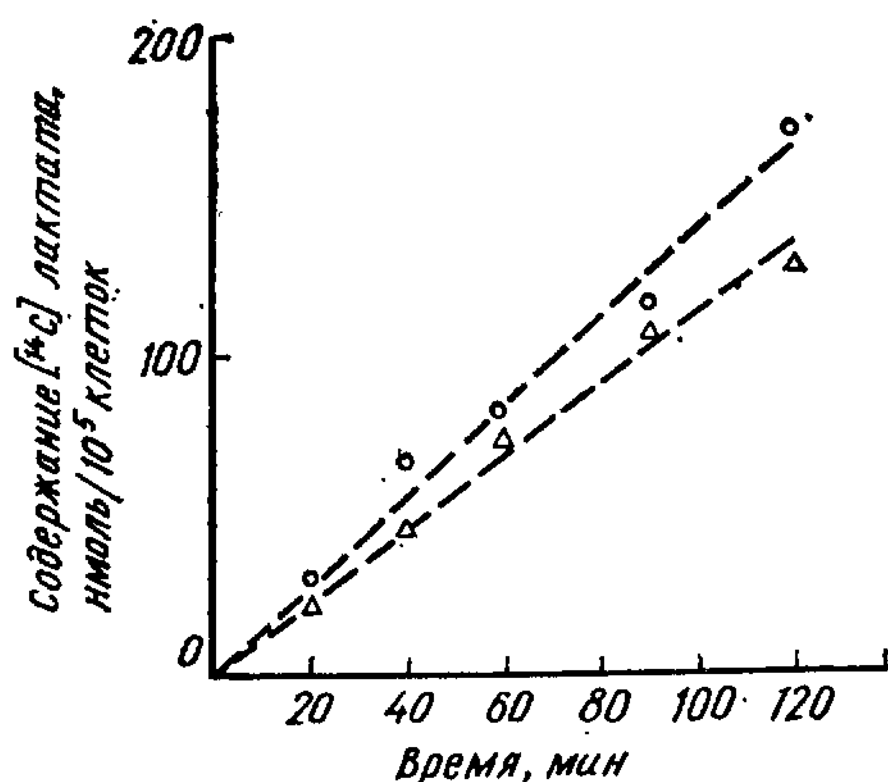


Рис. 9. Скорость образования (^{14}C)-лактата в клетках С3Н-10Т 1/2, трансформированных метилхолантреном в присутствии и отсутствие оубаина. Клетки МХА-С3Н-10Т 1/2 (3,7 × 10^5 клеток/пластинку) инкубировались в буферном солевом растворе Хенкса, при 37 °С в течение обозначенного времени. ○ — контроль; △ — обработка оубаином. К клеткам добавлялось 1 мкКи (^{14}C)-глюкозы, затем определялась радиоактивность (^{14}C)-лактата после разделения с помощью тонкослойной хроматографии по методу, описанному Tercyak и соавт. (1978).

Первоначально уровень формирования (^{14}C)-лактата из (U—^{14}C)-глюкозы исследовался в клетках С3Н-10Т1/2, трансформированных метилхолантреном. Использование тонкослойной хроматографии для определения радиоактивности (^{14}C)-лактата значительно повысило чувствительность измерения гликолиза (Tercyak et al., 1978). Этот быстрый, легко воспроизводимый метод представляет особую ценность, так как в монослойных культурах лишь ограниченное число клеток непостоянно продуцирует небольшое количество лактата. Как видно из результатов опыта, представленных на рис. 9, уровень гликолиза в клетках С3Н-10Т 1/2, трансформированных метилхолантреном (МХА), повышался линейно в течение первых 2 ч инкубации при 37 °С. Затем мы исследовали скорость формирования (^{14}C)-лактата в различные периоды роста клеток и чувствительность гликолиза к ингибитору Na^+,K^+-АТФаз — оубаину. Как видно из результатов опыта (табл. 2), уровень гликолиза в нормальных клетках С3Н-10Т1/2 относительно высок в логарифмической фазе клеточного роста и уменьшается в фазе сплошного монослоя. Также необходимо отметить, что когда клетки достигают состояния сплошного монослоя, уменьшается их чувствительность к оубаину.

Таблица 2. **Гликолиз клеток МХА/139-С3Н-10Т1/2 в химически определенной среде в присутствии и отсутствие сывороточного альбумина** [1]

Время после посева, дни	Контроль			+ БСА		
	Число клеток	(^{14}C)-лактат, нмоль/ч	(^{14}C)-лактат, нмоль/10^6 клеток · ч	Число клеток	(^{14}C)-лактат, нмоль/ч	(^{14}C)-лактат, нмоль/10^5 клеток · ч
3	1,17+10^4	0,05	—	2,11+10^4		
6	4,9+10^4	0,05	—	1,9+10^5	92	48,4
9	2,7+10^4	5,5	20,3	3,3+10^5	240	72,6
13	7,1+10^4	11,8	16,6	1,1+10^6	448	40,7
16[2]	9,8+10,5	0,05	—	7,9+10^5	134	16,9[2]

[1] Клетки инкубировались в течение 1 ч, как показано на рис. 1.
[2] Переживающая культура со значительно угнетенной жизнеспособностью.

Таким образом, уровень и природа аэробного гликолиза в этих клетках значительно зависят от стадии роста.

Учитывая повышенный уровень аэробного гликолиза в трансформированных клетках, было интересно далее изучить, снижался ли он при росте клеток, трансформированных МХА, в синтетической среде, где клетки имели морфологию нетрансформированных. Клетки, трансформированные МХА, при росте в среде FCRC-20 приобретают нормальный фенотип (Tomei, Bertram, 1978). Результаты определения уровня гликолиза в различные сроки после посева представлены в табл. 3. Можно видеть, что даже с помощью чувствительного метода формирования (^{14}C)-лактата гликолиз определялся только на 9-й и 13-й день после достижения сплошного монослоя. Уровень гликолиза в эти периоды был значительно ниже, чем в клетках, трансформированных МХА, растущих в ОСИ, обогащенной эмбриональной телячьей сывороткой, как показано на рис. 9. Также можно видеть, что при реверсии трансформированного фенотипа средой интенсивность гликолиза восстанавливалась до уровня, характерного для трансформированного фенотипа. Таким образом, условия окружающей среды значительно влияют на факторы, регулирующие такие метаболические параметры, как аэробный гликолиз, а также изменяют морфологию и угнетают пролиферацию, зависящую от плотности роста. По-видимому, аэробный гликолиз — условный параметр и не представляет собой неизменный, неотъемлемый процесс, характерный для трансформированной клетки.

Взаимоотношения клеточной адгезии, морфологии и экспрессии таких метаболических параметров, как аэробный гликолиз, несомненно, сложны, а наши знания все еще элементарны. Немного известно об изменениях гликолиза при нарушении клеточной пролиферации. Однако эти описанные предварительные эксперименты указывают па зависимость типа метаболического ответа от поверхностного прикрепления. Альтернативная точка зрения — введение бычьего сывороточного альбумина повышающего гликолиз до уровня, наблюдаемого в клетках, растущих в средах с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, изменяет реакции, лимитирующие уровень гликолиза, путем прямого воздействия на поверхностные белки или энзимы (Tomei, Bertram, 1978).

Гипотеза, объясняющая обратимый фенотип клеток Т-10Т 1/2, может основываться на концепции, что изменение клеточных адгезионных процессов препятствует модуляции экспрессии генетической информации. Таким образом, считается, что взаимодействие клеточной мембраны, лишенной сывороточных белков, главным образом альбумина и глобулинов, и инертного субстрата прикрепления, лишенного адсорбированных белков, ведет к изменениям клеточной мембраны, влияющим на экспрессию фенотипа злокачественной трансформации. Как следствие, гликолиз и жировой обмен несколько нормализуются. Однако опыт показывает, что организация этих функций на уровне популяции клеток, предположительно зависящая от клеточно—клеточных взаимодействий, не восстанавливалась.

5.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ, ВЫВОДЫ И ДАЛЬНЕЙШИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ПРИ НЕОПЛАЗИИ

По морфологическим признакам клетки определенного типа дифференцировки легко идентифицировать, но по функциональным, в частности по изменению энергетического обмена, трудно. Определение, например, такой функции, как скорость аэробного гликолиза в обычных условиях эксперимента в культуре, будет отражать изменение клеточной популяции в целом. Если бы обмен энергии был связан с другими маркерами, такими, как изменения клеточной поверхности и регуляция роста in vitro, это свидетельствовало бы о том, что отдельные клетки в популяции модулируют свой энергетический метаболизм. Модулирующими влияниями являются, вероятно, клеточно—клеточные взаимодействия, и хотя здесь мы обсуждаем мембранные взаимодействия, связанные с ключевыми регуляторными ферментами, вполне возможно, что в этот процесс вовлечены также другие механизмы клеточно—клеточных взаимодействий, такие, как прямой перенос цитоплазматического материала (Yotti et al., 1979).

Здесь необходимо остановиться на концепции случайных — неслучайных процессов в модельной популяции. В гомогенной популяции не все клетки ведут себя одинаково. Как упоминалось ранее, предположение Singer об едином генном продукте, возможно, опосредующем плейотипический ответ в клетках, инфицированных температурочувствительным мутантом, должно рассматриваться в свете того факта, что некоторые фенотипические маркеры трансформации суппрессируются в результате ассоциации с нетрансформированными клетками (Sivak, Van Duuren, 1970; Bertram, 1979). Теоретически комплексный многоуровневый ответ в системе, регулируемой по принципу обратной связи, может быть связан с одним параметром, но определение и спецификация этого параметра, судя по всему, крайне трудны. Более вероятно, что мутация, ассоциированная с неопластической трансформацией, приводит к специфическим нарушениям регуляторных систем нормальных тканей, возникающим на различных уровнях организации.

Как схематически показано на рис. 10, регуляция ткани или популяции клеток может быть прервана на многих уровнях организации, некоторые из этих нарушений неминуемо приводят к гибели клетки, другие — к наследственным летальным отклонениям или к неоплазии. Изменения таких фундаментальных факторов, как энергетический обмен и повышенный аэробный гликолиз, изучение которых началось с эмпирического наблюдения, были возведены до уровня первостепенного механизма (Warburg, 1930), а в настоящее время внимание исследователей привлечено к другим загадочным проблемам механизма канцерогенеза. Однако возможно, что в результате переоценки имеющейся информации ранее сделанные важные наблюдения в исследовании рака могут быть снова использованы уже в рамках новых концепций. Современные представления

1	Адгезия	Перенос информации из окружающей среды в клетку и/или из клетки в окружающую среду				
2		Структурная модификация мембран	Первичная регуляторная система, связанная с клеточной периферией			
3			Изменение взаимодействий жиры-белки	Функциональная модификация мембраны		
4				Изменение активности ферментов	Изменение кинетики компонентов множественной ферментной системы/регуляция фермент-субстрат и по принципу обратной связи)	
5					Регуляторная модификация метаболизма	Изменение концентрации продукта и/или скорости изменения его концентрации
						Продукция энергии

Рис. 10. Схематическое изображение взаимосвязи между уровнями многоклеточной организации и соответствующим общим функциональным уровнем в регуляции поведения клеток в популяции.

об обратимости клеточных процессов, которые ранее считались необратимыми, о многостадийности неоплазии и концептуализация их в плане генетического — эпигенетического контроля позволили сделать переоценку прежних наблюдений.

Появилась возможность сделать некоторые общие выводы в отношении неопластической трансформации. Злокачественный фенотип не обязательно объяснять возвратом клетки к «примитивному» состоянию (т. е. дедифференцировке, ретродифференцировке и т. п.). Возможно, что концепция раковой клетки как «ограбленной» клетки утратившей биохимические элементы, свойства и не обеспечивающей функцию пролиферации, ошибочна. Более правилен взгляд на опухолевую клетку, как на некоммуникабельную клетку, которая вместе с тем сохраняет различную степень способности функционировать с минимальными отклонениями метаболизма.

5.5. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Ash J. F., Vogt P., Singer S. J. (1976). Reversion from transformed to normal phenotype by inhibition of protein synthesis in rat kidney cells infected with a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 3603—3607.

Bailey J. M. (1967). Cellular lipid nutrition and lipid transport. In «Lipid Metabolism in Tissue Culture Cells» (G. H. Rothblat and D. Kritchevsky, eds.), pp. 85—109. Wistar Inst. Press, Philadelphia, Pennsylvania.

Bell P. B. (1977). Locomotory behavior, contact inhibition, and pattern formation of 3T3 and polyoma virus-transformed 3T3 cells in culture. J. Cell Biol. 74, 963—982.

Bertram J. S. (1979). Modulation of cellular interaction between C3H/10T cells and their transformed counterparts by phosphodiesterase inhibitors. Cancer Res. 39, 3502—3508.

Borek C., Grob M., Burger M. M. (1973). Surface alterations in transformed epithelial and fibroblastic cells in culture: A disturbance of membrane degradation versus biosynthesis. Exp. Cell Res. 77, 207—215.

Carroll R. C., Ash J. F., Vogt P. K., Singer S. J. (1978). Reversion of transformed glycolysis to normal by inhibition of protein synthesis in rat kidney cells infected with temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 5015—5019.

Chance B., Estabrook R. W., Williamson J. R., eds. (1965). «Control of Energy Metabolism» Academic Press, New York.

Christopher G. W., Kohlbacher M. S., Amos H. (1978). Transport of sugars in chick embryo fibroblasts: Evidence for a low affinity system and a high affinity system for glucose transport. Biochem. J. 158, 439—450.

Collett M. S., Eriksen R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2021—2024.

Erikson R. L., Collett M. S., Erikson E., Purchio A. F. (1979). Evidence that this avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 6260—6264.

Fagan J. B., Racker E. (1978). Determinants of glycolytic rate in normal and transformed chick embryo fibroblasts. Cancer Res. 38, 749—578.

Green H., Kehinde O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell 5, 19—27.

Green H., Meuth M. (1974). An established preadipocyte cell line and its differentiation in culture. Cell 3, 127—133.

Grinnell F. (1974). Studies on the mechanism of cell attachment to a substratum: Evidence for three diochemically distinct processes. Arch. Biochem. Biophys. 160, 304—310.

Hatanaka M. (1974). Transport of sugars in tumor cell membranes. Biochim. Biophys. Acta 355, 77—140.

Holley R. W. (1975). Control of growth of mammalian cells in cell culture. Nature. (London) 258, 487—490.

Kates M. (1972). In «Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology» (T. S. Work and E. Work, eds.), Vol. 3, Chap. 3, 4 and 7. Am. Elsevier, New York.

Kletzien R. F., Perdue J. F. (1974a). Sugar transport in chick embryo fibroblasts. I. A. functional change in the plasma membrane associated with the rate of cell growth. J. Biol. Chem. 249, 3366—3374.

Kletzien R. F., Perdue J. F. (1974b). Sugar transport in chick embryo fibroblasts. II. Alterations in transport following transformation by temperature-sensitive mutant of the Rous sarcoma virus. J. Biol. Chem. 249, 3375—3382.

Lee L., Weinstein I. B. (1979). Membrane effects of tumor promoters: stimulation of sugar uptake in mammalian cell cultures. J. Cell. Physiol. 99, 451—460.

Lee S. G., Lipmann F. (1977). Isolation from normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken fibroblasts of a factor that binds glucose and stimulates its transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 163—167.

Lipmann F., Lee S. G. (1978). A glucose binding-transport factor isolated from normal and malignantly transformed chicken fibroblasts. In «Microenvironments and Cellular Compartmentation» (P. A. Srere, and R. W. Estabrook, eds.), pp. 263—278. Academic Press, New York.

Moroney J., Smith A., Tomei L. D., Wenner C. E. (1978). Stimulation of $^{86}Rb^{+}$

and ^{32}P movements in 3T3 cells by prostaglandins and phorbol esters. J. Cell. Physiol. 95, 287—294.
Moskowitz M. S. (1967). Fatty acid-induced steatosis in monolayer cell cultures. In «Lipid Metabolism in Tissue Culture Cells» (G. Rothblat and D. Kritchevsky, eds.), pp. 29—62. Wistar Inst. Press, Philadelphia, Pennsylvania.
Nagle S. C., Brown B. (1974). Epstein—Barr virus from P3HR—1 cells grown in chemically-defined medium. Appl. Microbiol. 28, 518—520.
O'Brien T. G., Saladik D., Diamond L. (1979). The tumor promoter 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate stimulates lactate production in BALB/c 3T3 preadipose cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 103—110.
Papamatheakis J., Marciani D. (1979). Stimulation of sugar uptake and glycolysis in chicken embryo fibroblasts by the major glycoprotein from avian myeloblastosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 2784—2788.
Pardee A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1286—1290.
Pedersen P. (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. Prog. Exp. Tumor Res. 22, 190—224.
Racker E. (1976). «A New Look at Mechanisms in Bioenergetics», pp. 162—175. Academic Press, New York.
Reznikoff C. A., Bertram J. S., Brankow D. W., Heidelberger C. (1973). Quantitative and qualitative studies on chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. Cancer Res. 33, 3239—3249.
Robbins J. C., Nicholson G. L. (1975). Surfaces of normal and transformed cells. In «Cancer: A Comprehensive Treatise» (F. Becker, ed.), Vol. 4, pp. 3—54. Plenum, New York.
Romano A. H., Colby C. (1973). SV40 virus transformation of mouse 3T3 cells does not specifically enhance sugar transport. Science 179, 1238—1240.
Rozengurt E., Schneider J. A., Diamond I., Legg A. (1977). The high rate of aerobic glycolysis of transformed 3T3 cells persists after cell homogenization. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 83—90.
Schwartz R. I., Farson D. A., Soo W., Bissell M. J. (1978). Primary avian tendon cells in culture. J. Cell. Biol. 79, 672—679.
Singer S. J. (1975). Membrane fluidity and cellular functions. In «Control Mechanisms in Development» (R. H. Meints and E. Davies, eds.), pp. 181—192. Plenum, New York.
Singh M., Singh V. N., August J.—T., Horecker B. L. (1974). Alterations in glucose metabolism in chick embryo cells transformed with Rous sarcoma virus: Transformationspecific changes in the activities of key enzymes of the glycolytic and hexose monophosphate shunt pathways. Arch. Biochem. Biophys. 165, 240—296.
Singh M., Singh V. N., August J. T., Horecker B. L. (1976). Changes in activities of key enzyme of glucose metabolism in chick embryo fibroblasts during growth. J. Microsc. Biol. Cell. 25, 43—46.
Sivak A., Van Duuren B. L. (1970). A. cell culture system for the assessment of tumor promoting activity. J. Natl. Cancer Inst. 44, 1091—1097.
Taylor S. M., Jones P. A. (1979). Induction of adipocytes and monocytes in 10T and 3T3 cells treated with 5-azacytidine, Cell 17, 717—779.
Tercyak A., Kuan H., Salcedo L., Brecher P. (1978). Continuous measurement of ^{14}C-labeled carbon dioxide and lactic acid by cultured cells grown in Leighton tubes. Anal. Biochem. 86, 407—416.
Tomei L. D. (1981). Evidence for the restoration of growth control and appearance of adipocyte differentiation in transformed C3H-10T cells in protein free, lipid-free medium. J. Cell Physiol. (in preparation).
Tomei L. D., Bertram J. (1978). Restoration of growth control in malignantly transformed mouse fibroblasts grown in a chemically defined medium. Cancer Res. 38, 444—451.
Tomei L. D., Wenner C. (1978). Biological effects of phorbol esters in cell culture systems (W. Troll and I. B. Weinstein, eds.), Gold Spring Harbor Symposium, May 11—14, 1978.
Warburg O., ed. (1930). «The Metabolism of Tumors». Constable, London.

Weinhouse S. (1972). Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas. Cancer Res. 32, 2007—2016.
Weinhouse S., Langan J., Shatton J. A., Morris H. P. (1973). Fatty acids as metabolic fuels of cancer cells. In «Tumor Lipids: Biochemistry and Metabolism» (R. Wood, ed.), pp. 14—20. Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign, Illinois.
Wenner C. E. (1975). Regulation of energy metabolism in normal and tumor tissues. In «Cancer: A Comprehensive Treatise» (F. Becker, ed.), Vol. 3, pp. 389—403. Plenum New York.
Wood R. (1973). Tumor lipids: Structural and metabolism studies of Ehrlich ascites cells. In «Tumor Lipids: Biochemistry and Metabolism» (R. Wood, ed.), pp. 139—182. Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign, Illinois.
Yotti L. P., Chang C. C., Troska J. E. (1979). Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. Science 206, 1089—1091.

6

ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Мэри Пэт Мойер и Рекс С. Мойер

6.1. Введение 176
6.2. Группы трансформирующих вирусов 177
6.2.1. Общие свойства 177
6.2.2. Репликация против трансформации 179
6.3. Механизмы инициации и поддержания трансформации 180
6.3.1. Интеграция 180
6.3.2. Трансформирующий ген (ы) 182
6.4. Факторы инициации, селекции и онкогенеза трансформантов . . . 187
6.4.1. Выбор вирусов и клеток 188
6.4.2. Условия культивирования 192
6.4.3. Селекция трансформантов 193
6.4.4. Экспрессия ассоциированных с трансформацией параметров и онкогенез 193
6.5. Индукция и «спасение» вирусов из трансформированных и опухолевых клеток 195
6.5.1. ДНК-содержащие опухолеродные вирусы 196
6.5.2. Ретровирусы 198
6.5.3. Резюме 199
6.6. Слияние клеток и клеточная регуляция трансформации и туморогенности 199
6.7. Обоснованность и полезность модели вирусной трансформации . . . 201
6.7.1. Вирусы как окружающие канцерогены 201
6.7.2. Корреляция модельных систем с опухолями человека 208
6.7.3. Трансформирующие вирусы и биология клетки 210
6.8. Указатель литературы 210

6.1. ВВЕДЕНИЕ

Ранние наблюдения предполагали, что некоторые вирусы потенциально онкогенны, так как они могут индуцировать опухоли у животных и вызывать фенотипическую трансформацию культивируемых клеток. При этом проявлялись характеристики, обычно связываемые с опухолевыми клетками (см. обзор Tooze, 1973). Эти харак-

теристики включают бесконечность трансформации роста (Ponten, 1971), утрату контактного торможения и субстрат-зависимого ингибирования роста, сниженную потребность в сыворотке для роста, более высокие уровни Na^+, K^+-АТФаз, экспрессию эмбриональных антигенов и опухолеспецифических трансплантационных антигенов, усиленный транспорт гексоз и некоторых аминокислот, повышенный анаэробный гликолиз (эффект Варбурга), сниженные адгезию и количество фибронектина на клеточной поверхности, низкую организацию цитоскелета, сниженный уровень цАМФ, увеличенные секрецию активатора плазминогена, агглютинабельность лектинами и содержание гиалуроновой кислоты, уменьшение содержания ганглиозидов в липидах мембран. Так как связанные с трансформацией признаки детализированы в данной главе и в других работах (Hanafusa, 1977; Luria et al., 1978; Ponten, 1976; Tooze, 1973), они не будут подробно обсуждаться во введении.

Сходные признаки, обнаруживаемые в вирус-трансформированных и опухолевых клетках,— только одна из причин того, что трансформация клеток вирусами in vitro — широко используемая модель для изучения молекулярных событий, ведущих к неоплазии. Трансформация вирусами in vitro может быть сравнима с клеточными аспектами онкогенеза, в то время как при канцерогенезе у животных вовлечены осложняющие факторы и длительное время. В дополнение, вирусы обеспечивают генетические подходы к изучению молекулярной биологии клеточной трансформации и онкогенеза. Эта последняя особенность уникальна в смысле изучения трансформации вирусами, так как другие онкогенные агенты не могут быть генетически идентифицированы. В связи с тем что рак — наследуемое клеточное изменение, пробы с известными генетическими элементами, такими, как вирусы, обеспечивают первоначальный этап определения неизвестных генетических изменений, сопровождающих конверсию нормальной клетки в трансформированную или опухолевую.

Эта глава посвящена обзору современного состояния знаний о вирусах, способных трансформировать клетки или вызывать опухоли у животных, и сравнительной роли вирусов и клетки-хозяина в поддержании трансформированного фенотипа и потенции онкогенности. Литература по вирус-индуцированной трансформации весьма обширна. Поэтому, чтобы обеспечить читателя четкой библиографией, мы цитировали работы, обзорные статьи и более поздние, чем оригинальные исследования, источники.

6.2. ГРУППЫ ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ ВИРУСОВ

6.2.1. Общие свойства

Вирусы с онкогенным потенциалом могут иметь ДНК- или РНК-геном (Luria et al., 1978; Tooze, 1973). Существуют три больших группы ДНК-содержащих опухолеродных вирусов: папова-, адено-

и герпесвирусы [1]. Паповавирусы (от 45 до 55 нм в диаметре) имеют икосаэдральную морфологию и представлены только двуспиральной ДНК и протеином. Геном паповавирусов представлен циркулярной ДНК с молекулярной массой от 3 до 4 МД. Геном аденовирусов представлен линейной ДНК с молекулярной массой (мол. м.) от 20 до 25 МД и имеет инвертированные концевые повторы на каждом конце. Структурно и биохимически герпесвирусы наиболее сложная группа. Их геном с мол. м. 100 МД — часть сердцевины вириона, содержащейся в икосаэдральном капсиде диаметром 100 нм. Наружная липопротеиновая оболочка, выделенная из ядерной мембраны клетки-хозяина, окружает капсид. Полные вирионы с оболочкой имеют диаметр от 150 до 170 нм.

Составляющие группу РНК-содержащих опухолеродных вирусов, или ретровирусы (см. обзор Bishop, 1978; Hanafusa, 1977; Tooze, 1973; Vogt, 1977), — сфероидные частицы диаметром около 100 нм, имеющие диплоидную односпиральную РНК. Каждый РНК-гаплоидный компонент генома обладает мол. м. от 2,5 до 3 МД. Эта РНК и меньшие РНК, главным образом клеточные тРНК,— часть сердцевины нуклеопротеида (нуклеокапсид), так же как и вирионная РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза). Нуклеокапсид окружен липопротеиновой оболочкой со встроенными вирусными белками, которая образуется из цитоплазматической мембраны во время почкования вирионов. Морфология вириона и место созревания — основа одной из многих систем классификации ретровирусов. Базируясь на этой системе, различают три морфологических типа ретровирусов: А-тип (внутриклеточные частицы; центрально расположенный нуклеокапсид; оболочка образуется из интрацитоплазматических мембран), В-тип (вирусы рака молочных желез; внеклеточные частицы; эксцентричный нуклеокапсид; оболочка образуется из наружной цитоплазматической мембраны), С-тип (вирусы лейкозно-саркоматозного комплекса; внеклеточные частицы; центральный нуклеокапсид; оболочка образуется из наружной цитоплазматической мембраны). Наиболее интенсивно исследовались вирусы С-типа птиц и мышей.

РНК-содержащие опухолеродные вирусы С-типа делятся на лейкозные и саркоматозные вирусы, хотя деление между вирусами не является отчетливым. В общем саркоматозные вирусы трансформируют фибробласты в культуре, в то время как лейкозные вирусы обычно не трансформируют фибробласты, хотя они легко их инфицируют и реплицируются в них. Вирусы С-типа, которые не трансформируют фибробласты, относят к лейкозным вирусам, невзирая на их способность индуцировать неоплазию in vivo и независимо от типов неоплазии, которые они могут индуцировать. Хотя онкогенные лейкозные вирусы преимущественно лимфотропные, такая органотропность не столь очевидна для вирусов животных, инфицированных in utero (внутриутробно) (Jaenisch, 1980). В дополнение, не-

[1] Обычно выделяют четыре группы ДНК-содержащих опухолеродных вирусов. Четвертая — вирусы оспы (примеч. переводчика).

которые лейкозные вирусы птиц могут вызывать солидные опухоли так же, как лейкозы in vivo, и трансформировать фибробласты и гемопоэтические клетки in vitro (Graf, Beug, 1978). Кроме того, лейкозные вирусы обычно присутствуют в стоках саркоматозных вирусов.

6.2.2. Репликация против трансформации

ДНК- и РНК-содержащие опухолеродные вирусы имеют различающиеся способы репликации (Luria et al., 1978). Репликация ДНК-содержащих вирусов может быть по существу разделена на две фазы: раннюю, предшествующую синтезу ДНК, и позднюю, следующую за синтезом ДНК. Специфичные области вирусных генов транскрибируются в ранней фазе и кодируют «ранние» продукты генов, которые обычно вовлечены в синтез вирусной ДНК, стимулируя и (или) подавляя клеточный аппарат продукции вируса. Примеры ранних генных продуктов — внутриядерные «Т-антигены» паповавирусов и аденовирусов (Weil, 1978). Транскрипты вирусных генов, полученные после синтеза ДНК, обычно кодируют структурные белки вириона и белки, вовлекаемые в процесс вирусного созревания. Время, необходимое для завершения репликации вируса, варьирует в зависимости от вируса и хозяина. Репликация герпесвирусов осуществляется в течение нескольких часов, в то время как аденовирусов и паповавирусов — в течение двух или более дней. Особенности генетики и репликации аденовирусов (Ginsberg, Goung, 1977; Ginsberg, 1979) и паповавирусов (Fareed, Davoli, 1977; Kelley Nathans, 1979) лучше определены, чем генетики более сложных герпесвирусов (Roizman, 1979).

Ретровирусы — уникальные РНК-содержащие вирусы, в репликацию которых вовлекается образование ДНК в качестве провирусного интермедиата. Вирионная РНК-зависимая ДНК-полимераза делает копию ДНК (обратный транскрипт) вирусной геномной РНК. Эта копия ДНК ковалентно интегрируется в клеточную ДНК хозяина, где она обеспечивает матрицу для вирусной РНК, которая может быть упакована в вирионы или служить как мРНК. Не существует ранних или поздних фаз репликации ретровирусов по сравнению с репликацией ДНК-содержащих опухолеродных вирусов, но структурные особенности вирусной РНК, осуществляющие транскрипционный контроль следующих четырех основных участков генома: gag : группоспецифические антигены ретровирусов; (ii)pol : РНК-зависимая ДНК-полимераза; (iii-)env : оболочечные белки и (iv) src (или другие) : белок(и), связанные с саркомой (или другой опухолью) in vivo или трансформацией клеток онкогенными РНК-содержащими вирусами in vitro (Vogt, 1977; Van Zaane, Bloemers, 1978).

Способность вируса реплицироваться, персистировать или фенотипически трансформировать клетки варьирует в зависимости от вируса и клетки хозяина. Большинство ретровирусов продуктивно инфицирует клетки без их гибели. Таким образом, ретровирусы могут трансформировать клетки, в которых они растут. В противопо-

ложность этому большинство диких типов (wt) недефектных ДНК-содержащих опухолеродных вирусов не трансформирует пермиссивные клетки, в которых они реплицируются. Непермиссивные клетки, у которых по неизвестным причинам блокирована экспрессия поздних генов, и полупермиссивные клетки, в которых наблюдается ограниченная репликация, могут легко трансформироваться ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, однако частота их трансформации низка. В некоторых из этих клеток отмечается так называемая абортивная трансформация в связи с их способностью ревертировать к нормальному фенотипу. Некоторые герпесвирусы, такие, как вирус Эпштейна—Барр (EBV), имеют примечательную особенность, заключающуюся в неспособности реплицироваться в клетках, которые они трансформируют (Epstein, Achong, 1980; Reedman, Klein, 1973). Однако большинство этих трансформированных клеток содержит дефектные вирусные геномы или их субъединицы.

6.3. МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ И ПОДДЕРЖАНИЯ ТРАНСФОРМАЦИИ

Трудно отделить события, возможно ведущие клетку к трансформированному состоянию, от свойств, являющихся результатом трансформации. Это, в частности, касается изучения молекулярных механизмов, которые инициируют и поддерживают клеточную трансформацию.

Гипотезы, предложенные для объяснения, каким образом опухолеродные вирусы вызывают онкогенную трансформацию клеток, могут быть в основном идентифицированы как теории интеграции или «трансформирующего» гена(ов).

6.3.1. Интеграция

Возможна причинная взаимосвязь интегрированного состояния вирусного генетического материала в ДНК хозяина и измененного фенотипа клеток, трансформированных опухолеродными вирусами. Интеграция может произойти непосредственно в области гена, контролирующего рост, приводя его в функциональное состояние, или это может случиться в (или вблизи) участках оператора или промотора, что в результате изменяет регуляцию гена, контролирующего рост. Трансформация затем прямо следует за утратой существующих или приобретением новых функций. Соматическая мутация может быть результатом ошибочной репликации ДНК и (или) репарации, вызванной вирусной ДНК до или в течение интеграции. Синтез протеаз, таких, как активатор плазминогена, может явиться результатом индукции репарации типа SOS (Witkin, 1976; Miskin, Reich, 1980) повреждения ДНК, вызванного интеграцией вирусной ДНК. Исследования бактериальных профагов показали, что все эти события могут быть следствием интеграции ДНК фага в хромосому хозяина (Taylor, 1963; Nash, 1977; Witkin, 1976). Свидетельство «SOS»-подобного (Witkin, 1976) восстановления, наблюдаемого в клетках

человека и других приматов, получено в результате исследований, показывающих реактивацию облученного вируса (Jeeves, Rainbow, 1979) и увеличение синтеза ДНК в клетках, обработанных поврежденной ДНК (Moyer, неопубликованные наблюдения).

Последовательности вирусной ДНК, как ДНК-, так и РНК-содержащих опухолеродных вирусов, обычно ковалентно интегрированы в ДНК трансформированных клеток. Исключением могут быть герпесвирусы, чья ДНК может персистировать экстрахромосомально (Doerfler, 1975, 1977; Luria et al., 1978; Kapp, Westmoreland, 1976; Tooze, 1973). Интеграция может быть средством «фиксирования» вирусного генома, однако наличие неинтегрированной вирусной ДНК поддерживается во многих трансформированных клеточных линиях.

Многочисленные методики использовались для того, чтобы продемонстрировать ассоциацию вирусной и клеточной ДНК (см. обзоры Doerfler, 1975, 1977). В настоящее время существуют два наиболее широко используемых метода гибридизации нуклеиновых кислот для определения последовательностей вирусных и других ДНК: кинетика реассоциации ДНК (Gelb et al., 1971) и блот-гибридизация по Sauthern (1975) в модификации Botchan и соавт. (1976) и др. (например, Sutter et al., 1978). Такие данные по гибридизации in situ (Kucherlapati et al., 1978) указывают на то, что интеграция ДНК опухолеродных вирусов не сравнима с сайт-специфической интеграцией лизогенных бактериофагов, таких, как λ (см. обзор Nash, 1977). ДНК вирусов эукариотов интегрирует во множественные случайные места (см. Botehan et al., 1976; Collins et al., 1980, и указатель литературы здесь; см. также Sutter et al., 1978), хотя некоторые исследования указывают на специфические места хромосом для интеграции (дискутируется в работе Kucherlapati et al., 1978). Однако, если предположить, что случайная интеграция напоминает интеграцию бактериофага μ, следует быть осторожным при проведении подобных аналогий. Такой бактериофаг, который действует подобно транспозону и передвигается из одной области генома в другую (Bukhari, 1976), должен быть изолирован свободным от клеточной ДНК и многих других видов ДНК хозяина. Это позволило предположить, что вырезание вирусного генома не является точным. Вирусы эукариотов могут также приобретать клеточную ДНК хозяина при продуктивной инфекции (см. McCutchan, 1979, и указатель литературы здесь) или вырезании из интегрированного состояния (см. Botchan et al., 1979, 1980, и ссылки здесь). Однако этот случай, подобный случаю с μ-фагом, не является единственным. При нормальных условиях размножения вируса и бляшкоочищения клеточная ДНК хозяина не инкорпорируется в вирусную ДНК эукариотов. В дополнение, ДНК вирусов дикого типа может часто вырезаться из трансформированных клеток интактной, хотя это не всегда наблюдается (см. раздел V).

6.3.2. Трансформирующий ген (ы)

Механизм трансформации является необходимым условием для специфических вирусных генов и продолжающегося синтеза вирус-специфического продукта (ов) (например, трансформирующего белка), который инициировал и поддерживал бы трансформированный фенотип клетки. «Трансформирующие белки» могут оказывать прямое действие в одном или большем числе участков клетки или осуществлять непрямой, но воспроизводимый эффект (ы), инициирующий каскад характерных для трансформации событий, вызывая в конечном итоге их экспрессию. Например, нарушения мембраны, обусловленные мембраноассоциированными вирусными белками, могут иметь доминирующий эффект, приводящий в результате к трансформации клетки. Об этом свидетельствуют обнаруженные в ассоциации с клеточными мембранами «трансформирующие белки» РНК- и ДНК-содержащих опухолеродных вирусов (Anderson et al., 1977; Ito, 1979; Lin et al., 1977; Nicolson, 1976; Shiroki et al., 1979a; Willingham et al., 1979). Как прежде обсуждали (Moyer et al., 1979), способность этих мембраноассоциированных вирусных белков связываться с нуклеиновыми кислотами ускоряет трансформацию и (или) туморогенез. Это находится в противоречии с известной ролью этих белков как опухолевых вирус-специфических трансплантационных антигенов (Nicolson, 1976; Tooze, 1973).

Доказательство вовлечения специфических вирусных генов или генного продукта(ов) в трансформацию получено с помощью множества методических подходов, включая температурочувствительные (ts) мутанты, экспрессирующие трансформированный фенотип при пермиссивной температуре, но кажущиеся нетрансформированными при непермиссивной температуре; делеционные мутанты, утрачивающие определенные участки генома; субгеномные фрагменты вирусной ДНК, содержащие известные генные последовательности; трансляцию in vitro определенных участков генома; микроинъекцию продуктов вирусного гена.

6.3.2.1. ДНК-содержащие опухолеродные вирусы

Результаты применения этих методов к двум наиболее интенсивно изученным группам вирусов (аденовирусам и паповавирусам) указывают на то, что только ранние гены или их продукты необходимы для инициации и(или) поддержания трансформации. Невозможно детально описать все поддерживающие этот вывод данные, обсуждающиеся в многочисленных обзорах по опухолевой и молекулярной биологии этих вирусов (Fareed, Davoli, 1977; Flint, 1977; Ginsberg, 1979; Ginsberg, Gyoung, 1979; Graham, 1977; Kelly, Nathans, 1979; Tooze, 1973). В большинстве случаев авторы утверждают, что ранние (но не поздние) продукты генов экспрессированы в трансформированных и опухолевых клетках.

Трансфекция фрагментами ДНК, полученными с помощью рестрикционных эндонуклеаз, продемонстрировала, что ранние, а не

поздние, гены паповавирусов и аденовирусов могут трансформировать непермиссивные клетки (Abrahams et al., 1975; Graham et al., 1974; Graham, 1977; Sawada et al., 1979). Ранние и поздние гены паповавируса могут отдельно поддерживать свою биологически активную форму в некоторых пермиссивных клеточных линиях (Moyer et al., 1978), но ранние гены необходимы для стабильной трансформации первичных культур клеток (Moyer et al., 1981d). Рестрикционные фрагменты включают участки между 4 и 20 % левого генома аденовирусов и могут фенотипически трансформировать клетки in vitro (Graham, 1977). Клетки, трансфецированные меньшими фрагментами, обладают промежуточным трансформированным фенотипом (см. Shiroki et al., 1979, и ссылки здесь же). Эта ранняя область может кодировать трансформированные белки аденовируса (Ledinko et al., 1979).

«Трансформированные белки» герпесвируса остается определить. Camacho, Spear (1978) показали, что специфический фрагмент вируса герпеса простого может трансформировать клетки хомячка, экспрессирующие несколько фенотипов, ассоциированных с онкогенной трансформацией. Интересно, что продукты гена, кодируемые этим фрагментом генома, не принадлежат к самому раннему кинетическому классу вирусных белков в отличие от других ДНК-содержащих опухолеродных вирусов. Хотя трансформированные лимфобластные клеточные линии, продуцирующие и непродуцирующие вирус EBV, экспрессируют EBV-детерминированный ядерный антиген EBNA (Reedman, Klein, 1973), роль этого антигена в трансформации, если она существует, остается выяснить.

Исследования ts и делеционных мутантов аденовируса и паповавируса указывают, что вирусные «Т-(опухолевые) антигены», которые в иммунофлюоресцентной пробе видны в ядре инфицированных и трансформированных клеток, вовлечены в трансформацию (Weil, 1978). Однако ссылка на то, что Т-антигены являются белками, трансформирующими клетки, возможно, слишком большое упрощение. Принимая во внимание сложность роли антигенов в трансформации, мы рассмотрим детально некоторые аспекты трансформирующих белков одного из ДНК-содержащих опухолеродных вирусов (паповавируса обезьяны — SV40). Два известных генных продукта вируса SV40 экспрессированы в раннее время после продуктивной инфекции или в трансформированных непермиссивных клетках. Большой опухолевый Т-антиген, который является продуктом гена А-вируса SV40, имеет молекулярную массу около 94 кД. Тогда как меньший Т-антиген с молекулярной массой 17 кД разделяет концевые последовательности и антигенные детерминанты с Т-антигеном. Оба антигена могут быть иммунопреципитированы из инфицированных и трансформированных клеток антителами животных-опухоленосителей.

Существует достаточно доказательств того, что в онкогенных паповавирусах T(t)-антиген(ы) является трансформирующим белком (и), который обладает некоторыми определенными функциями в трансформированных и продуктивно инфицированных клетках (Weil,

1978). Т-антиген может следующее: запустить начало синтеза клеточной ДНК; инициировать репликацию вирусной ДНК; способствовать экспрессии поздних генов вируса SV40; регулировать его собственную транскрипцию; обеспечить функцию помощника для развития аденовирусов человека в клетках обезьян; вовлекаться в инициацию и поддержание трансформированного фенотипа. Как Т-антигены регулируют эти разнообразные физиологические процессы, неизвестно, однако активность АТФазы и других энзимов ассоциируется с Т-антигенами (см. Giacherio, Hoger, 1979, и ссылки здесь же). В дополнение, Т-антигены и(или) ассоциированные с ними белки хозяина отождествляют с поверхностными клеточными белками, вовлеченными в специфическую опухолевую трансплантационную устойчивость (Chang et al., 1979a; Coggin, 1979; Coggin, Ambrose, 1979; Lin et al., 1977; Schmidt-Ulrich, Wallach, 1978).

Продукты вирусных генов определяли обычными иммунологическими методами. Они включают иммунофлюоресценцию (с ее помощью Т-антигены обнаруживаются в ядрах клеток), комплемент-фиксацию и иммунопреципитацию меченными радиоактивными изотопами клеточными белками. Сыворотка и асцитическая жидкость, полученные от животных-опухоленосителей, являются обычными источниками антител к опухолевым вирус-специфическим антигенам. Специфичность этих антител может варьировать, а результаты комбинированных иммунологического и биохимического анализов показали, что некоторые белки, «специфически» иммунопреципитированные сывороткой, полученной от животных с вирус-индуцированными опухолями, вероятно, являются продуктами клеточных генов, которые ассоциируются с продуктами ранних вирусных генов (Chang et al., 1979б; Linzer, Levine, 1979; Gang et al., 1979). Хотя роль, если она существует, этих клеточных белков хозяина в трансформации остается по-прежнему неизвестной, эти наблюдения натолкнули на спекулятивные предположения, что сниженная способность некоторых мутантов SV40 трансформировать клетки (Bouck et al., 1978; Sleign et al., 1978), возможно, не результат отсутствия вирусного антигена, но может им быть в связи с наблюдаемым сопутствующим уменьшением ассоциированных клеточных белков хозяина (Melero et al., 1979, 1980; Gang et al., 1979), которые могут в конечном счете определить судьбу клетки в отношении ее трансформации вирусом.

Как подробно описали Martin и соавт. (1979a, b) и Seif и Martin (1979), существуют явные противоречия при определении роли Т-антигена паповавируса в поддержании трансформации с учетом видового происхождения клеток, источника клеток, условий, используемых для первоначальной селекции трансформантов. Клетки BALB/c 3T3, трансформированные мутантами SV40 по Т-антигену, отобранные из разросшихся в мягком агаре фокусов или колоний, были относительно температурочувствительными по трансформированному фенотипу (Kelley et al., 1980). И наоборот, с помощью селекции трансформантов крысиных фибробластов, инфицированных SV40- или ts-мутантами вируса полиомы по антигену, были идентифицированы клетки либо с температурочувствительным,

либо с температуроустойчивым фенотипом (Rassoulzadegan et al., 1978a, b; Seif, Cuzin, 1977). Различия множественности инфекции могут рассматриваться для указанных наблюдений (Kelley et al., 1980; Rassoulzadegan, Cuzin, 1980). Однако различия, наблюдаемые в клетках, с учетом видового происхождения, источника, условий культивирования и селекции трансформантов могут объяснить вариабельные результаты. Например, клетки крысы на ранних пассажах не будут отвечать так же, как и клеточная линия BALB/c 3T3 мышей, которая выделена из другого вида животных и была в культуре в течение десятилетий. Таким образом, трансформация не является особенностью кинетики только вируса, как предполагали некоторые молекулярные вирусологи, но преимущественно зависит от взаимодействия вирус — клетка в окружении, обеспечиваемом условиями культивирования. Эта идея была подкреплена в дальнейшем результатами изоляции клеток, трансформированных ts-мутантами паповавируса, в которых экспрессия трансформированного фенотипа зависела от клеточного цикла (Okada, Hahura, 1979).

Хотя большинство данных подтверждает роль Т-антигена (ов) в инициации и поддержании трансформированного фенотипа, исследования ревертантных клеток (многие из которых — Т-антиген-положительные), утративших большинство или все признаки трансформации, осложнили такую интерпретацию. Эти исследования показали, что присутствие генома SV40 или продуктов вирусного гена не обязательно должно сопутствовать продолжительной экспрессии трансформированного фенотипа (Steinberg et al., 1979; Toniolo, Basiline, 1975).

Steinberg и соавт. (1978) изучили несколько фенотипических вариантов клеток крысы, трансформированных SV40. Было продемонстрировано, что полный вирусный геном может поддерживаться в некоторых линиях без признаков экспрессии, что некоторые линии утрачивают генетическую информацию, ответственную за неспособность их клеток экспрессировать определенные продукты вирусного гена, такие, как Т-антиген. Хотя некоторые ревертантные линии не экспрессируют продукты вирусного гена и, вероятно, возвращаются к какому-либо типу контроля роста, клетки приобретают способность расти как пролонгированные субкультуры in vitro. Относительная роль вируса и хозяина в регуляции роста этих клеток остается неясной.

Очевидно, что продолжительный синтез клеточной ДНК хорошо коррелирует с поддержанием Т-антигена в этих ревертантах (Gurney E., Gurney T., 1979; Vogel et al., 1973) и других клетках (Hiscott, Defendi, 1979). В этом аспекте мы наблюдали, что некоторые Т-антиген-отрицательные ревертантные клетки после слияния с пермиссивными клетками (Moyer M., Moyer R., 1979) превращаются в Т-антиген-положительные и обнаруживают трансформированный фенотип до синтеза вирусной ДНК. В дополнение, эти гетерокарионы являются туморогенными (Moyer et al., 1979; 1981a).

К сожалению, различия видов использованных клеток, типов клеток, условий культивирования, методов селекции ревертантов

и т. д. не позволяют получить абсолютные ответы на относительную роль вируса и клетки в утрате трансформированного фенотипа в ревертантных клетках. Возможно, сверхпродукция Т-антигена в некоторых клетках регулирует его синтез и (или) других вирусных белков или белков хозяина.

6.3.2.2. Ретровирусы

Трансформирующие белки ретровирусов представлены в обзоре Stephenson et al., (1978). Эволюционно гены ретровирусов, возможно, произошли от клетки хозяина (Bishop, 1978; Stephenson et al., 1978; Vogt, 1977), в связи с этим они могут сегрегировать у инбредных животных (Cohen, Varmus, 1979). Последовательности гена ретровирусов, связанные с саркомагенной трансформацией, были обозначены src. С тех пор как установлено, что результаты исследования src белков ретровирусов птиц дали одно из лучших обоснований существованию вирус-специфических белков, поддерживающих трансформированное состояние, они рассматриваются более детально. При изучении фибробластов птицы, трансформированных птичьими саркоматозными вирусами (ASV), продолжительная экспрессия src — единственного гена опухолеродного вируса [1] необходима для установления и поддержания трансформированного состояния (см. обзор Hanafusa, 1977; Stephenson et al., 1978; Vogt, 1972). Ген кодирует синтез белка с мол. м. 60 кД (Brugge, Erikson, 1977) — протеинкиназы (Collett, Erikson, 1978), являющегося фосфопротеином (Levinson et al., 1978). Белок, имеющий мол. м. 60 кД, который представляли в системе трансляции in vitro Purchio и соавт. (1977), подобен, если не идентичен, белку 60 кД трансформированных ASV клеток курицы и опухолевых клеток хомячка, индуцированных ASV, что показано с помощью иммунопреципитации с сывороткой, полученной от кроликов-опухоленосителей (Brugge, Erikson, 1977). Хотя были описаны (Purchio et al., 1977) и белковые продукты гена src с меньшей молекулярной массой, способные возникать в результате посттрансляционного расщепления.

Так как продукт гена src — фосфопротеин с мол. м. 60 кД, действующий как протеинкиназа, предложили считать, что отклоняющееся от нормы фосфорилирование клеточных белков белком 60 кД может объяснить онкогенез, индуцированный ASV (Levinson et al., 1978). Однако взаимосвязь продукта гена src с туморогенезом остается неясной. Как показано в исследовании Poste, Food, 1979, ts ASV (ts-мутанты вируса ASV по гену src) вызывают температурозависимую экспрессию многих параметров трансформации in vitro. Однако эти параметры могут быть функционально не связаны со свойством туморогенности. Особый интерес представляют наблюдения, что

---

[1] В настоящее время известно 17 онкогенов, ответственных за злокачественную трансформацию клеток (примеч. переводчика).

ts ASV может вызывать опухоли при непермиссивной температуре у цыплят (Becker et al., 1977; Purchase et al., 1977), у которых нормальная температура тела составляет 42 °С. В дополнение, клетки, трансформированные ts ASV, могут формировать опухоли на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) эмбрионов кур. Как при пермиссивной, так и при непермиссивной температуре (Poste, Flood, 1979) температурочувствительный вирус выделялся из опухолей ХАО, предотвращая возможность рекомбинации с эндогенными src-последовательностями. Это дает основание предполагать, что многие температурозависимые свойства клеток, трансформированных in vitro ts ASV, не связаны с туморогенностью in vivo. Это не исключает, однако, то, что некоторые факторы окружения ХАО позволяют ts-мутантному гену ASV функционировать так, как если бы он был в пермиссивном окружении, т. е. продукт гена src, продуцируемый в ХАО, далее может и не повреждаться.

Особенно интересен тот факт, что дефектные по трансформации саркоматозные вирусы птицы с частичными (но не полными) делециями в гене src могут вызывать опухоли, когда вводятся в организм птиц (Hanafusa, 1977; Wang et al., 1979). Саркоматозные вирусы, выделенные из этих опухолей, вновь приобретали утраченную часть гена src, вероятно, за счет клеточных последовательностей (Halpern et al., 1979; Hanafusa et al., 1977; Robins, Duesberg, 1979; Vignier et al., 1979; Wang et al., 1978, 1979).

Физиологическая роль клеточных src-последовательностей и продуктов гена (Collett et al., 1979a, b) не известна, но изучение ts-мутантов ASV указывает, что продукт гена src может нарушать дифференцировку клеток in vitro (Moss et al., 1979). Возможно, это оказывает промоторное влияние на ген src (Bissel et al., 1979).

Остролейкозные вирусы птиц способны трансформировать фибробласты in vitro (Royer-Pokora et al., 1978) и in vivo (Graf et al., 1980), однако они не обладают нуклеотидными последовательностями, гомологичными гену src птичьего саркоматозного вируса (Graf, Beug, 1978). Их генетическая информация адекватна той, которую содержали уникальные трансформирующие последовательности длиной по крайней мере, 1500 нуклеотидов. Два прототипа острых лейкозных вирусов MC29 и MH2 имеют общие нуклеотидные последовательности, предположительно являющиеся эквивалентом гена src остролейкозных вирусов (Duesberg, Vogt, 1979).

6.4. ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ, СЕЛЕКЦИИ И ОНКОГЕНЕЗА ТРАНСФОРМАНТОВ

Противоречивые результаты, полученные многими исследователями при изучении вирусной трансформации, могут быть объяснены некоторыми незамеченными и игнорируемыми различиями систем, использованных исследователями.

6.4.1. Выбор вирусов и клеток

6.4.1.1. Вирусы

Необходимо рассмотреть ключевой вопрос, являются ли такими же, как и другие изоляты того же вируса и как первоначальные его изоляты, многие опухолеродные вирусы, которые сейчас изучаются в большинстве лабораторий. Такие свойства вируса, как рост клеточных культур до высоких титров в условиях быстрого размножения и образование легко изолируемых, видимых бляшек in vitro,— пара из многих свойств, отобранных исследователями, для облегчения изучения вируса. Однако необходимо учесть, что вирусы дикого типа, отобранные на основании этой пары свойств, могут быть вариантом вирусной популяции, в то время как неизолированные вирионы — действительно дикий тип.

Следовательно, историю вирусного изолята важно рассматривать как историю клеточных культур, использованных для размножения вируса, когда учитывается биологическая активность вируса как инфекционного агента. Небрежное отношение к истории вируса может повлиять на молекулярную биологию вируса. Примером, почему исследователи должны осознанно вникать в историю вируса, может служить судьба Huie-вируса, в частности Ad12 — наиболее используемого его штамма. Этот штамм был первоначально изолирован и пассировался в течение неизвестного промежутка времени в клетках почек эмбриона человека, вслед за этим он прошел неизвестное число пассажей в клетках, почек макак резус, затем 12 или более пассажей в клетках КВ и HeLa (описание в «NIAID Catalogue of Research Reagents, 1978—1980»). Так как репликация Ad12 могла быть лимитирована в клетках обезьяны в отсутствие SV40, вероятно, что культуры содержали SV40. С тех пор как гибридный вирус Ad12 — SV40 (с увеличенной онкогенностью) легко генерировался в течение совместного пассирования вирусов в клетках обезьяны (Tooze, 1973), небольшое количество информации SV40 (или клеток обезьяны) могло быть приобретено Ad12-штаммом Huie-вируса в течение пассирования клеток обезьян. Однако общепринятые методы анализа ДНК и определения последовательностей не использовались для проверки этой возможности или для сравнения этого штамма с другими свежеизолированными штаммами Ad12. Хотя предполагать, что этот штамм свободен от экзогенной генетической информации и доказана его идентичность другим изолятам Ad12, можно до тех пор, пока будут проведены необходимые эксперименты.

Аденовирусы, или их ДНК, или фрагменты ДНК ранней области 1 левого конца генома аденовируса могут трансформировать культивируемые клетки. Опухоли у сирийских хомячков могут вызывать только определенные аденовирусы, например аденовирус человека типа 12 (Tooze, 1973). Интересно, что объект исследования большинства работ по молекулярной биологии аденовирусов — 2 и 5 типы аденовируса человека, которые нетуморогенны, но могут трансформировать культивируемые клетки. Хотя с точки зрения онкогенеза это может вносить различия в окончательный анализ генетики

трансформации, данные, полученные на моделях указанных вирусов, очевидно, применимы для сравнения с трансформацией, индуцированной онкогенными аденовирусами.

При неопровержимости того, что вирусные мутанты — отличные модели, желательно иметь данные об их интенсивно развивающейся истории и о характеристике. Особенно это необходимо для мутантов, выделенных при химическом мутагенезе, в частности для ts-мутантов. С помощью различных проб, взятых из определенного участка генома, может быть обнаружена локализация основного дефекта. В мутированной ДНК могут присутствовать другие дефекты, не определяемые с помощью проб. Такие дополнительные мутанты бывают минорными, или несущественными, однако влияющими на инфекционность и(или) трансформирующую способность вируса. Интересно, что у мутантов, генерированных химическими мутагенами, некоторые участки мутируются легко, в то время как другие — трудно, если когда-либо мутируются вообще. Способ действия мутагенов в общем выяснен, механизм концентрирования мутагенов в определенных участках — нет. Вирус SV40 — соответствующий пример того. Хотя делеционные мутанты по t-антигену были изолированы, не были получены ts-мутанты по t-антигену с помощью химических мутагенов. И наоборот, ts-мутанты гена А (область Т-антигена) являются обычными.

История многих изолятов РНК-содержащих опухолеродных вирусов особенно важна с момента, когда они формируют стабильные рекомбинанты с высокой частотой и многие вирусы при этом содержат гомологичные последовательности и перекрестно реагирующие антигены, предполагающие эволюционную взаимосвязь (Vogt, 1977; Hanafusa, 1977; Tooze, 1973). Для первоначального изолирования «новых» вирусов использование кокультивирования и спасения дефектных вирусов является сомнительной практикой в отношении получения генетически «чистых» вирусов и (или) селекции субпопуляций вирусов (к примеру, Smith et al., 1979). Интересно, что клетки собаки и норки часто легко поддерживают размножение ретровируса. Еще должно быть выяснено, обеспечивают или нет эти клетки генетическими компонентами (или другими факторами) вирионы или просто некоторой функцией, необходимой для репликации. По отношению к селекции трансформантов ретровируса было показано (Graf et al., 1980), что клетки, трансформированные различными штаммами одного и того же вируса, формируют различные типы колоний в мягком агаре. Не менее серьезны вопросы — лабораторные артефакты вирусов и появление истинно патогенных вирусов, особенно после клонирования сублиний вируса, что может привести к различиям в его патогенности (Manly, Buffett, 1979) и круге хозяев (Yoshikura, Yoshida, 1978).

Генетическая нестабильность может быть неотъемлемым свойством ретровирусов, однако размножение этих вирусов в условиях высокой лабораторной вариабельности уменьшает вероятность того, что вирусы одинакового происхождения, и в действительности делает сомнительной их взаимосвязь с первоначальным изолятом вируса.

6.4.1.2. Клетки

Исход инфицирования клетки вирусом во многом зависит от происхождения клетки. Таким образом, выбор клеток чрезвычайно важен при планировании экспериментов по трансформации. Ясно, что ДНК-содержащие опухолеродные вирусы могут взаимодействовать с клетками многими путями, но основная предпосылка трансформации — отсутствие гибели клетки. Когда инфекционный паповавирус или аденовирус попадает в клетку, недавно выделенную из природного хозяина, он, возможно, реплицируется, чтобы образовать инфекционное потомство, и клетка погибнет. В таком случае клетка именуется пермиссивной, а инфекция называется продуктивной или литической. Существуют исключения, и совершенно другой ответ является результатом попадания вируса в клетку видов, чужеродных вирусу. В этом случае репликация либо подавляется полностью, либо может быть неэффективной, и клетка выживает. Эта клетка называется непермиссивной для вируса, а инфекция — непродуктивной или абортивной. Промежуточные этапы репликации могут также встречаться в полупермиссивных клетках. Неопластическая клетка может возникнуть как результат абортивной инфекции. Это может быть вызвано инфицированием непермиссивной клетки полным или дефектным вирусом или инфицированием пермиссивной клетки дефектным вирусом. В большей части исследований по изучению механизмов трансформации ДНК-содержащими опухолеродными вирусами использовались непермиссивные для вируса клетки и непермиссивные для вируса животные при изучении онкогенеза. Эти исследования, как правило, требуют значительного числа вирионов, инокулированных чужеродным хозяевам. Изучение туморогенеза часто требует инокуляции вирионов новорожденным, иммуносупрессированным, иммунодефицитным животным или нормальным животным в иммунологически привилегированные места. Формирование опухолей в этих условиях обычно занимает 4—6 мес и может продлиться год или более. Вероятно, что трансформация in vitro или туморогенез в непермиссивных системах может быть тесно связаны с этиологической ролью вирусов в природном раке. Вирус-индуцированные естественные опухоли животного (или человека), вероятно, вызваны вирусами, которые реплицируются в пермиссивных или полупермиссивных клетках их природного хозяина.

Не совсем ясно, почему некоторые клетки являются пермиссивными для данного вируса, а другие — нет. Вероятно, непермиссивная клетка утрачивает определенные факторы, необходимые для вирусной репликации. Непермиссивные клетки, трансформированные ДНК-содержащими вирусами и обладающие полным вирусным геномом в качестве провируса, экспрессируют только часть вирусных генов, а именно ранние гены. Репликация вирусной ДНК не наблюдалась, а поздние вирусные гены не транскрибировались и не транслировались. Пермиссивные клетки обладают факторами, способствующими сдвигу вирусного репликативного цикла от ранних генов к поздним. Учитывая эти различия, становится понятным, что пермис-

сивные, полупермиссивные и непермиссивные клетки неодинаково отвечают на вирус.

Другой важный момент в отношении клеточных культур заключается в том, что многие исследования по трансформации клеток опухолеродными вирусами проводились на клеточных линиях грызунов, таких, как 3Т3 и ВНК-21, или различных клонах этих линий. Клетки, поддерживавшиеся in vitro в течение длительного времени и в разных условиях, имеют сомнительную ценность нормальных клеток (Boone, 1975; Boone et al., 1979). Действительно, исследования в нашей и многих других лабораториях показали, что клетки ВНК-21/Cl 13 являются туморогенными для хомячков. Использование таких клеточных линий для трансформации ДНК-содержащими опухолеродными вирусами, которая в популяции встречается с относительно низкой частотой, поднимает несколько вопросов, связанных с селекцией субпопуляции и процессами трансформации. Казалось бы, что первичные клеточные культуры более подходят для изучения клеточной трансформации. Однако даже при использовании этих культур многие факторы, вероятно, определяющие их ответ, часто не рассматривались. Они включают следующие: виды, из которых выделены клетки; возраст животного; используемый метод для инициации культуры, однородность культуры; орган(ы), или тканевое происхождение; продолжительность культивирования; присутствие вирусов-пассажиров или других контаминантов. Все эти факторы важны, особенно при работе с клетками грызунов, которые «спонтанно» трансформируются in vitro (см. Barrett, 1980, и ссылки там же).

Важно также для сравнения с трансформированными клетками выбрать соответствующие нормальные клетки. Например, множество агентов, таких, как диметилсульфоксид, колибрен, диэтиламинодекстран и двухвалентные катионы, которые часто используются для изменения клеточной поверхности мембраны с целью увеличения попадания вируса или вирусных нуклеиновых кислот в реципиентные клетки. Хотя такие агенты известны своим действием не только на мембрану, но и другими свойствами, в частности транскрипцией генома, ложно инокулированные контроли, получавшие только эти агенты, редко использовались в последних исследованиях, сравнивающих вирустрансформированные и нормальные клетки. В интенсивных исследованиях клеточных линий почек африканских зеленых мартышек, трансформированных определенными участками генома вируса SV40 (Arizpe et al., 1981), показано, что ложно инокулированные клетки обнаруживали некоторые фенотипические различия по сравнению с необработанными родительскими клетками. Таким образом, должны планироваться эксперименты по сравнению свойств вирус-трансформированных, нормальных ложноинокулированных и нормальных родительских клеток.

Некоторые субкультуры и условия их культивирования чрезвычайно важны, но многие исследования, особенно по молекулярной биологии интеграции вирусного генома и персистирования, часто проводят на культурах неизвестного уровня, в которых проис-

ходит много удвоений популяции после первоначального этапа трансформации. Клонируемые популяции, используемые для сравнительных исследований, могут быть выделены из этих клеток только на более поздних пассажах. Тем не менее для объяснения первоначальных событий вирус-индуцированной трансформации часто использовались данные, полученные при изучении этих клеток.

Последняя особенность, обнаруженная при изучении клеточных культур — возможная контаминация случайными агентами, включая вирусы (переносчики персистирующих инфекций или провирусов), микоплазму, бактерии, грибки или другие микроорганизмы. Некоторые из многих типов экспериментов, которые сопровождались такими контаминациями, включают исследования ДНК- или РНК-полимераз, требований для клеточного фактора роста, популяций и синтеза ДНК и РНК.

6.4.2. Условия культивирования

Условия поддержания клеточной культуры и число субкультур или удвоений популяции в определенный период времени часто не учитывались при экспериментальном планировании и представлении или сравнении данных с результатами, полученными другими исследователями.

Обычно принималось, что клеточные культуры поддерживались в виде монослоя или суспензий, варьирующих по их ростовым свойствам in vitro, и что клетки со способностью расти в суспензии как агрегаты могут обладать более высокой онкогенной потенцией. Для клеток, растущих монослоем или в суспензии, как и для клеток с их комбинированным ростом, можно подобрать условия культивирования. Методы и схемы субкультивирования и выбор среды, в которой клетки будут расти, крайне важны. Некоторые предназначены для роста клеток в суспензии. Культуральные среды, используемые для размножения клеток в монослое, высоко вариабельны, и специфический выбор особенной среды редко проводится исследователями. Например, обоснованно ли сравнивать свойства клеток, растущих в минимальной среде Игла, свободной от антибиотиков, но содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, с клетками, растущими в среде Ham (F-10), содержащей 5 % телячьей сыворотки, 1 % лошадиной сыворотки, 10 % триптозофосфатного бульона, 1 % экстракта куриных эмбрионов и антибиотики.

Тем не менее литература насыщена результатами исследований, авторы которых в затруднении объяснить, почему их результаты несравнимы с другими результатами, даже когда различия условий культивирования очевидны. Пример важности культуральной среды — результаты экспериментов по колониеобразованию трансформированных делеционными мутантами паповавируса клеток в мягком агаре, гд число трансформированных колоний варьировало в зависимости от различных сред (Bendig, Folk, 1979).

6.4.3. Селекция трансформантов

Как описано выше, выбор вируса, клеток и условий культивирования — первоначально важные переменные в селекции трансформанта. Следующая важная переменная — метод(ы), используемый для селекционирования трансформированных клеток из популяции клеток, подверженных воздействию трансформирующего агента. Исключая количественные пробы с очищенным вирусом, демонстрирующие, что одна вирусная частица вызывает единственное трансформированное событие, невозможно определить, что «трансформированные» колонии, развивающиеся в клеточной культуре,— более восприимчивая субпопуляция клеток или возникает из вариантов вируса. Хотя отобранные трансформированные клетки могут содержать вирусную нуклеиновую кислоту и(или) экспрессировать продукты вирусного гена, мало исследований было посвящено «нетрансформантам» в инфицированных культурах на присутствие в них вирусных последовательностей или белков.

Чаще всего как примеры фенотипических различий трансформантов использовались «плоские» ревертанты трансформированных клеток часто с акцентом на молекулярную биологию первоначальных трансформантов и ревертантов. Такие исследования были изящно запланированы и в результате продемонстрировали многочисленность генетических нарушений и перестроек, сопровождающих фенотипические изменения. Клонируемые популяции обычно использовались для сравнения клеток при изоляции родительских клеточных линий и клонов. Однако этим же методом и часто в таких же условиях культивирования отбирали и специфическую ассоциацию генотип — фенотип. Селекция трансформантов может быть результатом различий в кариотипе (Clark, Pateman, 1978), что может найти свое отражение в фенотипе и туморогенности получающихся в результате культивирования клеточных линий. В некоторых системах, селекция колоний, выращенных на агаре с определенными характеристиками, может быть селекцией для клеток, трансформированных различными вирусами или различными штаммами вируса (Graf et al., 1980).

6.4.4. Экспрессия ассоциированных с трансформацией параметров и онкогенез

Становится ясным, что все трансформированные клетки не являются идентичными в отношении экспрессии трансформационно чувствительных параметров. В куриных эмбриональных фибробластах, трансформированных близкородственными штаммами Брайан и Шмидт — Руппина вируса саркомы Рауса (RSV), обнаружены многочисленные морфологические и другие различия (см. Bader, Bader, 1976; Hanafusa, 1977), включая иммунологически различимые белки гена src (Levinson et al., 1978). Несколько дефектных по трансформации (td), температурочувствительных (ts) мутантов RSV различаются их способностью индуцировать в куриных клетках некоторые клеточные проявления трансформации при непермиссивной и полу-

пермиссивной температурах (Bescer et al., 1977; Friis et al., 1977; Weber, Friis, 1979). Например, клетки, инфицированные td- и ts-мутантами RSV, могут иметь нормальную морфологию и потребление гексозы при рестриктивной температуре, однако продолжают расти с увеличенной скоростью (Calothy, Pessac, 1976). Кроме того, МС 29 (птичий остролейкозный вирус) трансформирует фибробласты, вызывая морфологические изменения, утрату актиновых филаментов, увеличение агглютинабельности лектином и способности расти в мягком агаре на клетках. Однако клетки, трансформированные МС 29, не утрачивают фибронектин, способность к увеличению потребления гексозы, повышению уровня активатора плазминогена и туморогенеза in vivo (Royer-Rokora et al., 1978).

Дальнейшее подтверждение разделимости трансформационно-чувствительных параметров получено в работе Beug и соавт., (1978). Используя клетки, инфицированные td- и ts-мутантами RSV, они исследовали роль ядра в экспрессии и реверсии параметров трансформации при пермиссивной и непермиссивной температурах. Энуклеированные цитоплазмы обратимо приобретали или теряли свойственную для трансформированного состояния морфологию, микроворсинки и складки, актиновые филаменты и фибронектин во время соответственно повышения или понижения температуры. Энуклеированные цитоплазмы сохраняют исходную (до удаления ядра) скорость транспорта гексозы независимо от последующей температуры инкубации. Таким образом, транспорт гексозы назвали «ядерно-зависимым» параметром, для изменения которого, по-видимому, требуется синтез РНК de novo. Другие параметры обозначены как ядернонезависимые.

Из большого числа исследований, демонстрирующих клеточную трансформацию вирусами, только несколько свойств трансформации анализировались в отдельных экспериментах, а окончательный тест на онкогенную потенцию, т. е. туморогенность, не всегда осуществлялся. Это важно, потому что не все клетки, трансформированные in vitro, имеющие свойства, подобные опухолевым клеткам, являлись туморогенными даже тогда, когда тестировались на туморогенность у сингенных, новорожденных, иммуносупрессированных животных в иммунологически привилегированных местах или у бестимусных мышей, которые утрачивают клеточно опосредованную иммунную систему. Туморогенность коррелировала с фенотипом трансформированных клеток по независимости роста от субстрата (Freedman, Shin, 1974; Shin et al., 1975), сниженному уровню клеточного поверхностного фибронектина (Chen et al., 1976, 1978; Galimore et al., 1977) и другим фенотипическим характеристикам трансформированных клеток (Barrett et al., 1979; Pollack et al., 1975; Rifkin et al., 1974). Однако, как указывали Poste, Flood (1979), характеристика(и) преобладающей трансформации зависит от переменных каждой системы. Таким образом, данные параметры могут быть вспомогательными для определения способности клеток формировать опухоли. В этом плане важно отметить, что клеточные линии предположительно «нормального» фенотипа могут формировать опухоли

при соответствующих условиях (Boone, 1975; Boone et al., 1979) и утрачивать морфологические и другие критерии трансформации, не теряя туморогенность (Lan et al., 1979).

Как обсуждалось выше, экспрессия раннего вирусного гена(ов), вероятно, вовлечена в инициацию и поддержание трансформированного фенотипа в клетках, трансформированных ДНК-содержащими опухолеродными вирусами. Однако неизвестно, могут ли одни эти гены вызывать опухоли у восприимчивых хозяев. Некоторые данные (Moyer et al., 1979) позволяют предположить, что в определенных системах может потребоваться полный геном, необходимый трансформированным клеткам, чтобы приобрести генетическую информацию от хозяина. Дополнительное сравнимое наблюдение свидетельствует о том, что полученные с помощью рестриктаз фрагменты ранней области генома SV40 не индуцируют опухоли у хомячков, хотя эти фрагменты трансформируют клетки in vitro (Moyer et al., 1981b, c).

6.5. ИНДУКЦИЯ И «СПАСЕНИЕ» ВИРУСОВ ИЗ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Потенциальная биологическая активность персистирующего генома опухолеродного вируса лучше всего демонстрировалась спасением инфекционного или трансформирующего вируса из клеточной культуры, поддерживающей вирусный геном. Обработка трансформированных клеток физико-химическими агентами, слияние трансформированных клеток с пермиссивными клетками или трансфекцией ДНК трансформированных клеток в пермиссивные клетки являются обычно наиболее эффективными методами для достижения результатов. Культивирование трансформированных клеток с пермиссивными клетками также проделано для так называемого спасения вируса, однако мы наблюдали пониженную эффективность его в клетках, трансформированных паповавирусами. Различные модификации этих методов в соединении с биохимическими методами, используемые для изучения взаимодействия вирус — клетка хозяина (Doerfler, 1975, 1977), были предприняты для спасения провирусных геномов и выяснения механизма(ов), с помощью которого оно осуществляется. Биологические методы слияния этих клеток (Watkin, 1975), энуклеированных клеточных компонентов (Pringle, 1977) или трансфекции ДНК (Graham, 1977; Zhdanov, 1977) проанализированы в обзорах.

Множество биохимических (Air, 1979) и электронно-микроскопических (Evenson, 1977) методов было использовано для анализа вирусных геномов дикого, дефектного и спасенного типов. Эти методы включают спасение дикого типа с дефектным и спасенным по отношению к рестрикционной эндонуклеазе вирусом, или другим резанным эндонуклеазой фрагментам, гибридизацию нуклеиновых кислот, картирование гетеродуплекса, R-петли, секвенирование ДНК. С помощью таких методов можно определить локализацию делеции, замещения, инверсии, дополнения и т. д. в вирусных геномах. Замещенные последовательности клетки хозяина, которые предположи-

тельно возникают в результате ошибочного вырезания интегрированной вирусной ДНК, также определяют этими методами (Botchan et al., 1979, 1980). Молекулярный анализ вирусов может быть дополнен оценкой in vitro и in vivo способности вируса реплицироваться в пермиссивных клетках, трансформировать непермиссивные клетки и вызывать опухоли у животных.

6.5.1. ДНК-содержащие опухолеродные вирусы

Клетки, трансформированные ДНК-содержащими вирусами, обычно не продуцируют инфекционный вирус, даже если содержат вирусную ДНК, интегрированную в геном хозяина (Tooze, 1973; Doerfler, 1977). Вирусы были спасены из некоторых систем вирус — клетка, однако некоторые попытки спасения были безуспешными. Так как клетки, трансформированные вирусами полиомы мышей и SV40 обезьяны, подвергались наиболее интенсивному изучению, они рассмотрены ниже в деталях.

Аденовирусы не были спасены из трансформированных клеток даже после слияния с пермиссивными клетками (Doerfler, 1977; Tooze, 1973). Хотя большинство экспериментов было относительно кратковременным и пермиссивные клетки могли быть не лучшими, персистирование неполных геномов, или интенсивная фрагментация генома (см. Sutter et al., 1978; см. также Doerfler, 1977, и ссылки на изложенный здесь материал), или метилирование интегрированного генома (Gunthert et al., 1976) могут объяснить негативные результаты спасения аденовирусов. С тех пор как получены продуцирующие и непродуцирующие линии клеток, трансформированные вирусом герпеса (Reedman, Klein, 1973), были разработаны эксперименты по спасению, которые могут быть предназначены для увеличения репликации вируса в продуцирующих клетках или инициации вирусной репликации в непродуцирующих клетках, в которых индуцибельность может варьировать (Bister et al., 1979; Magrath et al., 1979).

Трансформированные вирусом полиомы клетки хомячка обычно не продуцируют инфекционный вирус даже после слияния с пермиссивными мышиными клетками (Doerfler, 1977; Folk, 1973; Prasad et al., 1976; Zouzias et al., 1977). Причины этого неизвестны. Однако линии клеток хомячка, трансформированные определенными термочувствительными по Т-антигену мутантами вируса полиомы, продуцируют инфекционную вирусную ДНК или вирус полиомы вслед за слиянием, когда температура изменяется от непермиссивной к пермиссивной (Folk, 1973). Это позволяет предположить, что для спасения могут быть необходимыми Т-антигены вируса полиомы. В случае вируса полиомы спасение инфекционного вируса с помощью физической или химической индукции, слияния клеток было наиболее эффективным для трансформированных клеток крысы (см. Fogel, 1975, и ссылки там же; также Prasad et al., 1976; Zouzias et al., 1977). Это вполне вероятно, потому что клетки крысы являются полупермиссивными для вируса полиомы, содержат некоторое количество неинтегрированных молекул вирусной ДНК (Prasad et al.,

1976) и продуцируют низкие уровни инфекционного вируса (Fogel, 1975). Репликация вируса в этих клетках может быть увеличена обработкой клеток агентами, такими, как митомицин С (Zouzias et al., 1977).

Клетки пермиссивные (обезьяны) или полупермиссивные (человека или хомячка) для репликации SV40 и трансформированные недефектным SV40 могут продуцировать низкие уровни инфекционного вируса или легко индуцироваться физическими или химическими агентами для освобождения вируса (см. Zavialle et al., 1978, и ссылки там же; см. также Moyer et al., 1977, 1978). В некоторых случаях химические индукторы могут продуцировать инфекционный SV40 только при слиянии с пермиссивными клетками (см. Watkins, 1975, и ссылки здесь же), но некоторые трансформированные клетки мышей непермиссивные являются индуцибельными (Zavialle et al., 1978).

SV40 более легко может быть спасен из трансформированных полупермиссивных клеток (например, клеток человека или хомячка), которые содержат неинтегрированную (так же, как и интегрированную) вирусную ДНК (Moyer et al., 1980).

В большинстве случаев слияние — наиболее эффективное средство спасения, но в некоторых клеточных линиях, как доказано, эффективнее трансфекция ДНК из трансформированных клеток в пермиссивные (Boyd, Butel, 1972). Эффективное спасение вируса продемонстрировано в пермиссивных клетках, трансформированных различными методами трансфекции (Zhanclov, 1977), включая трансфекцию клеточной ДНК из клеток, содержащих полные геномы (Boyd, Butel, 1972), контрансфекцию клеточной ДНК из клеток, содержащих частичные геномы с определенными комплементарными фрагментами ДНК (Lipotich et al., 1980), целые хромосомные наборы. Для некоторых клеточных линий, содержащих полные вирусные геномы, однако, спасение является более трудным так как, для него необходимо субкультивирование гетерокарионов после слияния или реципиентных клеток после трансфекции (Moyer, Moyer, 1979). Это предполагает необходимость синтеза ДНК или серии случайных рекомбинационных событий вырезания, которые в конечном счете будут сопровождаться продукцией инфекционного вируса. Геном может существовать в качестве субгеномных фрагментов или быть неконтагиозным в некоторых клеточных линиях, хотя это не предотвращает спасение, если есть полный геном-эквивалент (Moyer et al., 1978; Moyer, Moyer, 1979).

Механизм(ы) спасения вируса, посредством которого(ых) интегрированные вирусные геномы становятся свободно реплицирующимися, не известен, но многие результаты наблюдения показывают, что в спасение включены как вирусные, так и клеточные факторы хозяина. Обработка трансформированных клеток индуцирующими агентами, такими, как основной аналог, перед слиянием увеличивает продукцию инфекционных частиц (Watkins et al., 1975). Различные системы вирус — клетка оптимально индуцируются различными агентами (Kaplan et al., 1975; Watkins, Dulbecco, 1967). Ви-

русная индукция может зависеть от стадии клеточного цикла (Kaplan et al., 1975), а вирусные Т-антигены могут быть необходимыми для спасения (Basilico et al., 1979; Bothan et al., 1979; Moyer, Moyer, 1979; Sleigh et al., 1978).

Работа, осуществленная с энуклеированными клетками или цитоплазматическими экстрактами некоторыми исследователями, продемонстрировала, что цитоплазма пермиссивной клетки может обеспечить необходимый(е) фактор(ы) для спасения вируса (Crose, Karrowski, 1974; Pringle, 1977; Righthand, 1974). Результаты исследования синхронизации клеток показали, что кроме присутствия Т-антигена репликация ДНК SV40, по-видимому, зависит от события или фактора, происходящего в поздней G_1- и ранней S-фазе клеточного цикла (Gershey, 1979). В результате экспериментов по изучению клеточной гибридизации установили, что контролирующие синтез ДНК в клеточном цикле факторы обычно бывают цитоплазматического происхождения. Icekson, Ganiv (1979) сообщили, что транскрипция in vitro ядер, изолированных из клеток почек обезьян, инфицированных SV40, стимулировалась цитозольной фракцией клеток обезьян. Дискуссии о предполагаемой роли ядра без рассмотрения цитоплазматических факторов (Botchan et al., 1979) были преждевременны в связи с первыми предположениями (Watkins, Dulbecco, 1967), что способность гетерокарионов продуцировать вирус зависела от числа ядер в клетках обезьян при слиянии. Необходимо отметить, что эти клетки могли также иметь более пермиссивную клеточную цитоплазму.

Итак, результаты различных исследований индукции паповавирусов показали, что те трансформированные линии, которые спонтанно освобождают вирус или продуцируют неинтегрированную вирусную ДНК, химически индуцибельны гораздо больше, чем трансформированные линии, в которых спонтанная продукция не наблюдается. В некоторых клеточных линиях для спасения вируса требуется слияние клеток или трансфекция ДНК (часто во взаимодействии с химической индукцией). Это может быть отражением различий пермиссивности индуцибельных линий, в особенности вирусного генома, поддерживаемого в клеточных линиях, или техники, используемой для спасения.

6.5.2. Ретровирусы

Вирусы-помощники могут быть использованы для спасения дефектных по репликации ретровирусов (см. обзоры Bishop, 1978; Hanafusa, 1977; Vogt, 1977). Они обеспечивают соответствующие вирусные структурные белки. Спасение интегрированных саркоматозных вирусных геномов из трансформированных клеток с помощью коинфекции или суперинфицирования вирусами-помощниками — обычно используемый метод оценки ретровирусов, особенно тех, которые являются потенциально лейкозными, так как лейкозные вирусы помогают репликации саркоматозных. В дополнение, репликация дефектных ретровирусов может быть спасена при слиянии

с клетками, содержащими вирус-помощник, который поставляет полный набор генов репликации (Steimer, Boettinger, 1977).

Различные агенты, включая галогенизированные пиримидины, дезоксиглюкозу, дибутирил-цАМФ, ингибиторы трансляции или анаэробный стресс, могут индуцировать эндогенные ретровирусы, по-видимому, удалением транскрипционных контролей (Aaronson et al., 1974; Anderson, Matovcik, 1977; Lowry et al., 1971; Prochownik et al., 1976; Varnier, Levy, 1979). Повреждение ДНК, вероятно, вовлечено в индукцию вируса (Rascati, Tennant, 1979). Глюкокортикоиды могут in vitro влиять на индукцию или инфекцию несколькими вирусами (Costa et al., 1973; Dudley, Butel, 1979; Magrath et al., 1979; Morhenn et al., 1973; Nishiyama, Rapp, 1979; Paran et al., 1973).

Трансфекция высокомолекулярной клеточной ДНК из клеток, трансформированных ретровирусами, в соответствующие пермиссивные клетки может приводить к спасению вируса (см. обзор Hill, Hillova, 1974). Однако для спасения вируса из некоторых клеток требуется, чтобы клеточная ДНК была разрезана. Это наблюдение привело к предположению, что действующий в *цис*-положении контрольный элемент клеточного генома предотвращает спасение интегрированного провируса (Cooper, Temin, 1976; Catala, Vigier, 1979). Сходным образом, когда клеточная ДНК из негативных по Т-антигену ревертантов крысиных клеток, трансформированных SV40, разрезалась рестрикционными энзимами, которые режут клеточную, но не вирусную ДНК, SV40 более легко спасался по сравнению с трансфекцией высокомолекулярной ДНК (M. P. Moyer, неопубликованное наблюдение). Хотя то, что в *цис*-положении действует контрольный элемент,— привлекательная гипотеза, существует и другая вероятность, что вирусная ДНК диких клеток не колинеарна и фрагментация увеличивает потенцию к рекомбинации, чтобы можно было произвести интактный геном. Исследования до настоящего времени не опровергают эту альтернативу.

6.5.3. Резюме

В итоге, сложные взаимоотношения репликации ДНК, клеточного деления и репарации ДНК затрудняют сделать простые заключения о механизме(мах) спасения. Хотя некоторые из этих отношений становятся более определенными. Для индукции профага наше нынешнее примитивное состояние знаний биологии клеток эукариотов и нехватка соответствующих мутантов этих клеток мешают немедленному познанию механизма(ов) спасения провируса из генома клеток эукариотов.

6.6. СЛИЯНИЕ КЛЕТОК И КЛЕТОЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСФОРМАЦИИ И ТУМОРОГЕННОСТИ

С целью оценки клеточного генетического контроля трансформации или туморогенности, вызванной вирус-трансформированными или другими трансформированными клетками, были осуществлены

многочисленные исследования слияния клеток. Результаты поздних экспериментов так же, как и результаты ранних (см. обзор Ozer, Gha, 1975; Ringertz, Savage, 1976), оказались противоречивыми. В большинстве исследований установлено, что межвидовые гибриды высокотуморогенных и нетуморогенных клеток обычно нетуморогенны до тех пор, пока отобраны субпопуляции, утратившие нормальный хромосомный набор (Gee, Harris, 1979; Ozer, Jha 1975; Ringertz, Savage, 1976; Stanbridge, 1976; Stanbridge, Wilkinson, 1978). Это предполагает, что нормальный статус является доминантным. В противоположность этому, в других исследованиях межвидовых клеточных гибридов доминантным признаком была туморогенность (Aviles et al., 1977; Crose, Koprowski, 1970; Kucherlapati, Shin, 1979). Доминантность туморогенности этих межвидовых гибридов позволяет предположить, что нормальные клетки одних видов не могут осуществлять регуляцию роста опухолевых клеток различных видов. Такая интерпретация была бы точной, если бы не было описанных выше межвидовых гибридов или если бы нормальные клетки не подавляли, как это установлено, туморогенность клеток различных видов (Jonasson, Harris, 1977; Jonasson et al., 1977; Moyer et al., 1981b; Shkolnik, Sachs, 1978). Другая интересная серия наблюдений за туморогенностью клеточных гибридов (и других клеток) позволила предположить, что в некоторых системах для туморогенности необходима экспрессия большей части, если не всего, вирусного генома (Moyer et al., 1979, 1981a, b, c; Arizpe et al., 1981). Например, когда трансформированные SV40 клетки крысы, которые не экспрессируют продукты вирусного гена и не являются туморогенными (Steinberg, 1978), подвергали слиянию с пермиссивными клетками обезьян, вирусный геном экспрессировался и вирус спасался (Moyer, Moyer, 1979), а гибридные клетки становились туморогенными (Moyer et al., 1981a). Как альтернатива, персистирующая экспрессия некоторых вирусов может подавлять туморогенность (Reid et al., 1979).

Хотя название недавнего обзора (Sideborrom, 1980) — «Анализ злокачественности слиянием клеток», более подходящим названием с тех пор, как были получены данные, противоречащие исследованиям о доминантности злокачественности при слиянии нормальных и опухолевых клеток, должно быть — «Подавление злокачественности слиянием опухолевых клеток с нормальными». Тем не менее этот обзор представляет особый интерес в плане поверхностного клеточного гликопротеина(ов), имеющего молекулярную массу 100 кД и выделенного из различных трансформированных и опухолевых клеток, так как экспрессия этого протеина(ов) была подавлена в нетуморогенных клеточных гибридах. Такой белок, вероятно, может быть позитивным регулятором и может быть очищен вместе с некоторыми, кодируемыми вирусом, клеточными поверхностными белками, такими, как ОСТА вируса SV40 (Chen et al., 1977).

Хотя недавние исследования слияния клеток были проанализированы более (по сравнению с другими отраслями биологии) элегантной и искушенной молекулярной биологией и была использована более (по сравнению с другими моделями) дорогая и чувствительная

к опухоли модель животных — бестимусные мыши, данные остаются противоречивыми, как и в ранних экспериментах. Таким образом, первоначально поставленный вопрос о генетической регуляции трансформации и онкогенеза ожидает дальнейшего прояснения.

6.7. ОБОСНОВАННОСТЬ И ПОЛЕЗНОСТЬ МОДЕЛИ ВИРУСНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

6.7.1. Вирусы как окружающие канцерогены

Одна из наиболее вызывающих интерес проблем, стоящих перед вирусологами в настоящее время,— потенциальная роль вирусов в развитии рака у человека (De The et al., 1976; Potter, 1979). Прямого пути решения этой проблемы не существует и поэтому прилагаются большие усилия для изучения опухолеродных вирусов животных [1]. Вирусы, вероятно, вызывают опухоли или могут быть вовлечены в развитие опухолевого процесса в естественных условиях (в противоположность индуцированным в лабораторных условиях), что будет обсуждено ниже.

6.7.1.1. Паповавирусы

Онкогенные паповавирусы включают полиомавирус мышей, вирус 40 (SV40) обезьян, папилломавирусы (см. обзоры Luri et al., 1978; Rapp, Westmoreland, 1976; Tooze 1973; Weil, 1978).

Вирусы полиомы и SV40 реплицируются у своих природных хозяев и в пермиссивных клеточных культурах, но есть лишь небольшая вероятность возможности предполагать их онкогенность для их хозяев. Исследования по трансформации и туморогенности с этими вирусами проведены в непермиссивных или полупермиссивных клетках или хозяевах.

Папилломавирусы — естественные паразиты некоторых видов животных, включая и человека. Они ответственны за доброкачественные опухоли, известные как бородавки (см. Orth et al., 1971, и ссылки там же). В бородавке обнаружено большое количество вируса. Папилломавирусы не реплицируются в культивируемых клетках in vitro и редко вызывают цитопатогенный эффект. Папилломавирусы случайно трансформируют культивируемые клетки с очень низкой эффективностью.

Паповавирусы BK и JC человека обладают сходством и имеют эволюционную взаимосвязь с вирусами SV40 и полиомы (Lai et al., 1979; Newell et al., 1979). Сероэпидемиологические исследования указывают, что вирусы BK и JC практически универсальны в их распределении среди человеческой популяции, однако эти вирусы редко вызывают заболевания и, вероятно, только у больных с нарушенной иммунной системой. О низкой эффективности трансформации tn vitro и туморогенезе, наблюдаемом у лабораторных грызунов, вызванных

[1] К настоящему времени выделен вирус HTLV и показана его этиологическая роль в развитии некоторых Т-клеточных лимфом человека (примеч. переводчика).

паповавирусами, сообщалось. Последовательности нуклеиновой кислоты ВК обнаружены у человека при некоторых видах рака (Fiori, di Mayorca, 1976), однако это было опровергнуто (Wold et al., 1978). Принято, что паповавирусы человека не играют важной роли как природные этиологические агенты рака у человека.

6.7.1.2. Аденовирусы

Существует свыше 80[1] серотипов аденовирусов. Они были выделены из организма широкого множества животных. Тридцать один из них — человеческого происхождения. Различные аспекты этих вирусов рассмотрены в обзорах (Flint, 1977, 1979; Ginsberg, Yound, 1977; Tooze, 1973).

Аденовирусы человека вызывают подострые респираторные инфекции, конъюнктивиты и энтериты. Их большинство реплицируется только в человеческих клетках, однако серотипы 2 и 5 реплицируются в клетках хомячка, а серотип 2 может также реплицироваться в клетках крысы. Некоторые серотипы аденовирусов могут индуцировать опухоли после инокуляции новорожденным хомячкам. Аденовирусы человека разделены на три большие группы в зависимости от их относительной онкогенности для новорожденных хомячков, в частности, онкогенная группа А, слабо онкогенная группа В и неонкогенная группа С. Члены всех трех групп, однако, способны трансформировать клетки грызунов in vitro, но с низкой эффективностью и низкой частотой.

Не существует доказательств того, что человеческие аденовирусы — этиологические агенты опухолевой болезни человека. McAllister и соавт. (1972) обследовали несколько образцов человеческого рака на присутствие специфической к аденовирусу РНК и получили отрицательные результаты. Сероэпидемиологические исследования подтвердили вывод, что человеческие аденовирусы являются неонкогенными для их нормальных хозяев.

6.7.1.3. Герпесвирусы

Герпесвирусы — большая группа убиквитарных вирусов, от одного до четырех различных типов присутствуют в каждом виде обследованных животных. Большинство природных популяций животных широко инфицировано и антитела к герпесвирусу обнаружены почти у всех взрослых их членов. У природных хозяев герпесвирусы часто вызывают персистентные субклинические инфекции. Они характеризуются латентным состоянием, при котором вирионы не определяются до тех пор, пока редкие рецидивы острой инфекции ни появятся даже в присутствии гуморальных антител. Пермиссивные клетки, продуктивно инфицированные герпесвирусами, погибают в то время, когда вирус реплицируется. Герпесвирусы могут

---

[1] К настоящему времени выделено и охарактеризовано свыше 90 серотипов аденовирусов (примеч. переводчика).

трансформировать клетки, вызывая наследственные изменения фенотипа, который мы распознаем как характерный для трансформированных клеток.

Несколько герпесвирусов ассоциируются с туморогенезом у различных видов, включая человека, и такие ассоциации, если они являются причинными, вероятно, вовлекают абортивные инфекции или дефектные вирусные геномы. Исходя из проблемы причинности, вопрос о том, вызывает ли данный вирус опухоль или он является просто пассажиром опухолевых клеток, не разрешен для всех индуцированных герпесвирусом неоплазм. Однако постулаты Коха о причинной связи неоплазий у животных были удовлетворены для нескольких герпесвирусов, и эти системы могут служить моделями, необходимыми для изучения роли человеческих герпесвирусов при неоплазиях у человека.

Постулаты Коха были удовлетворены для герпесвирусов, вызывающих два неопластических заболевания животных: болезнь Марека цыплят (Purchase, 1972) и лимфома обезьян (Fleckenstein, 1979).

Вакцины, предотвращающие заболевание, были получены на основе аттенуированного в культуре тканей герпесвируса болезни Марека или антигенно родственного непатогенного герпесвируса индюшек (Purchase et al., 1971). Это значительно поддерживает этиологическую роль вируса в заболевании.

Herpesvirus saimiri был выделен из первичной культуры почек здоровой беличьей обезьяны, в частности Saimiri sciureus, однако он вызывает быстрорастущие летальные лимфомы после инокуляции ночным и светло-коричневым обезьянам, капуцинам, мармозеткам и кроликам (Melendez et al., 1970). Сходная ситуация существует для H. ateles, полученного от здоровой паукообразной обезьяны. Этот вирус вызывает лимфому у мармозеток. Убитая H. saimiri вакцина может предохранять животных от развития злокачественной лимфомы (Laufs, Steinke, 1975).

Вирус Эпштейна—Барр (EBV) является герпесвирусом, который реплицируется исключительно в В-лимфоцитах человека, вызывая трансформацию без цитопатогенного действия. Сероэпидемиологические исследования установили, что инфицирование EBV человеческой популяции почти универсально. Клинические проявления заболевания, вызванные этим вирусом, самые разнообразные, однако наиболее общий результат инфекции человека — субклиническое течение болезни. Различные клинические проявления постоянно ассоциировались с высоким уровнем антител к EBV, что существенно поддерживает, но не доказывает его этиологическую роль. Два из этих клинических проявлений — неопластические: лимфома Беркитта и назофарингеальная карцинома. Третье — доброкачественно протекающий инфекционный мононуклеоз.

Ассоциация лимфомы Беркитта и EBV основана на следующих фактах: определении ДНК EBV или антигенов EBV в опухоли; трансформации культивируемых В-лимфоцитов человека; индукции

лимфом EBV у приматов; наличии высоких титров антител у больных с лимфомой по сравнению с общей популяцией; корреляции характера антителообразования и прогноза опухолевого заболевания. Все это существенно поддерживает идею об этиологической связи существующей между EBV и лимфомой Беркитта, однако возможность того, что EBV является вирусом-пассажиром, не исключена. Даже если EBV обладает онкогенными потенциями для человека, несоответствие, наблюдаемое между почти универсальным распределением вируса и появлением EBV-ассоциированных неоплазм, свидетельствует о необходимости взаимодействия вируса с коканцерогенами. Африканская лимфома Беркитта ассоциируется с персистированием вируса, являющимся предрасполагающим фактором к лимфоме Беркитта у детей, однако для развития опухоли требуются дополнительные факторы. Такие факторы могут быть генетическими и/или внешними. Малярия — эндемическая болезнь в регионах, где преобладает лимфома Беркитта, может быть одним из таких факторов. Другим таким фактором может быть возраст, в котором произошло первичное инфицирование EBV.

Основная масса случаев заболевания лимфомой Беркитта, встречающихся в других регионах мира, не может быть связана с EBV, даже если эти два типа опухоли не различаются морфологически.

Случай ассоциации EBV и другого типа рака у человека, в частности назофарингеальной карциномы, основан на тех же критериях, что и при ассоциации EBV и лимфомы Беркитта. Рак носоглотки встречается достаточно часто у китайцев южной провинции Квантунг, пик заболевания приходится на 45-летний возраст.

Во всех биопсиях карциномы, полученных в мире, обнаружено присутствие ДНК EBV. Вирусная ДНК обнаружена в раковых клетках, но не в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль.

Первичное инфицирование EBV наблюдается в раннем возрасте, однако опухоль развивается в зрелом возрасте. Длительный интервал между первичной вирусной инфекцией и образованием опухоли предполагает вовлечение кофакторов. Для китайцев генетическая предрасположенность к опухоли кажется очевидной.

В сущности выяснено, что EBV — этиологический агент инфекционного мононуклеоза (Henle, Henle, 1972). Нет доказательств того, что дополнительные кофакторы вовлечены в процесс. Различные аспекты биологии EBV, включая его роль как инфекционного агента мононуклеоза и потенциального инициатора малигнизации при лимфоме Беркитта и раке носоглотки, были рассмотрены de The (1979) и Epstein, Achong (1980).

Результаты эпидемиологического исследования демонстрируют четкую ассоциацию рака шейки матки и половой активности. Заболевание практически не встречается у девственниц и частота заболеваемости увеличивается у женщин с активной половой жизнью. Ассоциация этого рака с беспорядочностью в половой жизни предполагает венерически передающийся инфекционный агент, вовлекаемый в его этиологию. Вирусы, которые, как известно, вызывают инфекции женских половых органов,— вирус герпеса простого 2-го

типа (HSV2), цитомегаловирус и папилломавирус, вызывающий бородавки гениталий. Эти вирусы являются обычными, если один или более из них вовлечены в этиологию рака шейки матки, существование кофакторов должно быть учтено для того, чтобы объяснить несоответствие, существующее между редким возникновением опухоли и относительно частым обнаружением вируса. Как экспериментальные, так и эпидемиологические данные свидетельствуют о связи HSV2 с раком шейки матки (De The et al., 1976), а некоторые исследования предполагают роль HSV1 в развитии карциномы полости рта (Shilitol, Silverman, 1979).

6.7.1.4. Ретровирусы

А. вирусы лейкозно-саркоматозного комплекса. Сейчас широко принято считать, что ретровирусы могут вызывать лейкозы и солидные опухоли у широкого множества животных в экспериментальных и природных условиях, могут ли ретровирусы также вызывать опухоли у человека — все еще открытый вопрос, подтверждением чего является факт, что до сих пор не выделен ретровирус, ответственный за опухоли человека. Если бы такое выделение было бы осуществлено, то удовлетворить постулаты Коха было бы трудно.

Значительные усилия, поддерживаемые Национальным институтом рака, продемонстрировать роль ретровирусов при лимфомах и лейкозах человека не сопровождались выделением ретровируса человека. Однако получено непрямое доказательство того, что неоплазмы человека могут быть ассоциированы с ретровирусами, в частности демонстрация гомологии нуклеиновых кислот опухолевых клеток человека и известных ретровирусов животных.

Стимулом для поиска ретровируса человека явилась концепционная модель — гипотеза онкогена / вирогена (Huenbner, Todaro, 1969; Temin, 1971; Todaro, Huebner, 1972; Todaro, 1978; Weiss, 1975). Эта гипотеза онкогена / вирогена была предложена для объяснения спонтанного проявления полных инфекционных ретровирусов типа С в культивируемых клетках и тканях животных определенного вида млекопитающих. Информация для продукции этих вирусов, как гипотетически предполагалось, передавалась генетически от родителей к потомству (вертикальная трансмиссия). Активация этой в норме репрессированной генетически передающейся информации об эндогенном вирогене типа С, скорее, чем инфекция извне (горизонтальная трансмиссия), была предложена как наиболее частый механизм, с помощью которого вирусы типа С вызывают естественно встречающиеся опухоли. Согласно этой гипотезе эндогенные вирогены типа С представлены последовательностями гена, которые являются интегральной частью хромосомальной ДНК хозяина и кодируют продукцию вирусов типа С. Онкогены — клеточные гены, ответственные за трансформацию нормальной клетки в опухолевую. Эндогенные вирогены и онкогены должны быть в норме репрессированы, но могут быть дерепрессированы некоторыми внутренними факторами (т. е. гормональными и генетическими) или внешними (т. е. радиацией,

химическими канцерогенами или другими инфицирующими вирусами).

Горизонтальная трансмиссия ретровирусов установлена в нескольких случаях, например для вирусов лейкоза кошек, лимфомы гиббона, лейкоза крупного рогатого скота.

Weiss (1978) описал несколько случаев, когда контрольные вирусы (которые могут инфицировать клетки других видов) могут представлять угрозу для здоровья исследователей. Существует несколько используемых экспериментальных процедур (например, обработка клеток галогенизированными пиримидинами, глюкокортикостероидами и т. д.; смешивание культуры лимфоцитов; гибридизация соматических клеток человека и мыши; трансплантация человеческих тканей иммуносупрессированным или бестимусным мышам; трансфекция), каждая из которых может активировать ксенотропные вирусы. Активация ксенотропных вирусов может также повлиять на результаты или интерпретацию экспериментальных данных. Наиболее известный пример этого — открытие ретровируса, названного RD 114, в клетках рабдомиосаркомы человека вслед за пассированием клеток через мозг эмбрионов кошек. RD 114 был объявлен человеческим опухолеродным вирусом. Позднее было открыто, что RD 114 является эндогенным, ксенотропным вирусом кошек, который размножался в клетках человека.

В дальнейшем фенотипическое смешивание наблюдалось между эндогенными и экзогенными ретровирусами, а также между эндогенными ретровирусами и другими вирусами, делая возможным комбинации, которые изменяли круг хозяев.

Наконец, генетическая рекомбинация между экзогенным и эндогенным ретровирусами приводит к дальнейшему расширению генетической вариабельности системы.

Не существует прямого доказательства того, что ретровирусы патогенны для человека, хотя Teich (1975) и Panem (1976) со своими сотрудниками представили свидетельства того, что ретровирусы могут быть ассоциированы с лейкозом и системной красной волчанкой, соответственно.

Эндогенные вирусы были выделены из разных тканей различных видов здоровых павианов. Однако ни один из них не был выделен из многочисленных тканей многих видов приматов Старого и Нового света. Неудача в выделении эндогенных ретровирусов большинства приматов может указывать на то, что большинство ретровирусов приматов или дефектны, или репрессированы, или до сих пор используются методы, не соответствующие их определению.

Инфекционные ретровирусы были получены от шерстистых обезьян и гиббонов. Эти вирусы в естественных условиях распространяются от животного к животному и являются туморогенными. Нет доказательства того, что ретровирусы шерстистой обезьяны и гиббона — эндогенные вирусы приматов.

Существует некоторое основание полагать, что горизонтально передающиеся ретровирусы шерстистой обезьяны и гиббона могут быть вовлечены в индукцию рака человека. Из ряда лабораторий

сообщали о выделении полных инфекционных вирусов типа С из человеческого материала. Обратные транскриптазы клеток человека, больного острым лейкозом, оказались антигенно родственными полимеразам ретровирусов шерстистой обезьяны и гиббона. Есть несколько сообщений о присутствии антител в сыворотках здоровых доноров и пациентов с различными заболеваниями к антигенам ретровирусов (Aoki et al., 1976; Kurth et al., 1977; Herbrink et al., 1980). Однако такое основание является открытым для интерпретации, как обсуждалось Kiessling, Youlian (1979), а также другими (см., например, Moyer, 1979) исследователями.

Б. Вирусы опухоли молочной железы. Впечатляющая история исследований опухолей молочной железы у инбредных животных показала, что большинство видов мышей содержит свой собственный вирус опухоли молочной железы (MTV), иногда не один.

Мышиные MTV делятся на три общие группы: 1-я — высоко или умеренно онкогенные вирусы, которые могут передаваться от матери к дочери с молоком и индуцировать карциномы молочной железы в раннем возрасте; 2-я — низко онкогенные вирусы, которые обычно передаются яйцом или спермой и индуцируют карциномы молочной железы в позднем возрасте; 3-я — непродуцирующие вирусы, передающиеся как вирусы 2-й группы. В опухолях не отмечается продукция вирионов, однако открытые вирионы могут быть индуцированы субкультивированием или радиацией.

Морфологически мышиный MTV представлен вирионами типа В и обнаружен в молочных железах и их опухолях, в молоке. Интрацитоплазматические вирусные частицы типа А часто обнаруживаются в клетках, инфицированных MTV, и могут представлять собой либо предшественники, либо продукты частиц типа В.

В 1970 г. вирус (в частности, вирусы обезьян Мезон — Пфайзер или MPMV) был выделен из спонтанной опухоли молочной железы макаки резус. MPMV морфологически отличается от мышиного MTV (ретровируса типа В) и ретровирусов типа С. Этот вирус размножается в клетках человека и приматов.

С помощью электронной микроскопии в женском молоке обнаружены частицы, подобные по размерам и морфологии MTV (Feller, Chopra, 1969). Spiegelman и сотрудники выделили MPMV-подобные частицы из ткани молочной железы человека. Частицы содержали высокомолекулярную РНК и обратную транскриптазу. РНК из опухолей молочной железы человека гибридизировали с РНК MTV (Axel et al., 1972). Обратная транскриптаза из человеческого молока оказалась иммунологически родственной энзиму MPMV (Ohno, Spiegelman, 1977). Культивируемая клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека продуцирует частицы с характеристиками ретровирусов (Keydar et al., 1973).

Взятые вместе, факт вирусной этиологии опухолей молочной железы мышей и серьезное, но не прямое, доказательство связи вирусов с заболеванием человека свидетельствуют о том, что ретровирусы типа В могут играть роль в возникновении рака молочной железы человека.

6.7.1.5. Резюме

Несмотря на интенсивные усилия, приложенные исследователями в течение последних 10 лет, и большое число полученных в результате данных, до сих пор окончательно не доказана роль вируса в развитии рака у человека. Все же существует несколько кандидатов в вирусы, которые могут быть в конечном счете ответственными за некоторые неоплазмы человека.

В общем неоплазия у человека не имеет эпидемиологических особенностей типичного инфекционного заболевания, хотя существуют некоторые довольно убедительные примеры пространственно-временного группирования случаев. Хорошо известно, что эпидемиология многих заболеваний обнаруживает «сплетение причинной связи», в которое вовлечены многие взаимодействующие факторы, как генетические, так и факторы окружающей среды (включающие инфекционные агенты). Критический вопрос заключается в следующем: являются ли вирусы существенными компонентами заболевания или они выступают как пассажиры в этом процессе? Другими словами, существует проблема: вирусы вызывают рак или опухоли вызывают вирусы?

Принимая во внимание убедительные данные в пользу вирусной этиологии многих опухолей животных, маловероятно, что вирусы не являются существенными компонентами, по крайней мере, некоторых опухолей человека.

Опыт эффективной профилактики опухолей (у животных, для которых инфекционная вирусная этиология является определенной, например лимфосаркома кошек и болезнь Марека) вакцинами вселяет значительную надежду на будущее.

Как предполагалось многими исследователями, более 80 % опухолей человека является скорее результатом влияния окружающей среды, чем генетических факторов. Если это утверждение справедливо, инфекционные вирусы могли бы считаться факторами среды наряду с физическими и химическими агентами, а эндогенный вирус — генетическим фактором. Исключая несколько форм, не существует строгого доказательства, что генетические факторы играют существенную роль в развитии рака человека. Heston (1975) сделал обзор генетики опухолей животных, из которого становится ясным, что восприимчивость или резистентность к большинству опухолей животных имеет генетическую основу.

6.7.2. Корреляция модельных систем с опухолями человека

Хотя трансформация in vitro культивируемых клеток (вирусами и другими агентами) обеспечила клеточную и молекулярную биологию множеством данных, существует большой пробел в обнаружении их корреляции с неоплазиями у человека, 80 % которых являются карциномами. Клетки, происходящие из таких опухолей, являют-

ся эпителиальными. Однако основная масса экспериментальных моделей (включая вирусы), существующих для изучения неопластической трансформации, включает фибробластоподобные клетки. Фибробласты доминируют при росте большинства тканевых эксплантантов, и они переживают субкультуры при обычных условиях для растущих клеток in vitro. В результате, особенности роста и трансформации фибробластов лучше определены, чем свойства роста и трансформации эпителиальных клеток. Эпителиальные клетки не только растут при различных по сравнению с фибробластами условиях культивирования (см. Gilbert, Migeon, 1975, 1977; Leffert, Paul, 1972; Mather, Sato, 1979; Price et al., 1980; White et al., 1978), но характеристики трансформации фибробластов не являются подходящими для трансформации эпителиальных клеток.

Например, фибробласты и другие клетки соединительной ткани экспрессируют большое количество фибронектина на клеточной поверхности (Hynes, 1976; Yamada, Olden, 1978), однако мало или вовсе не обнаруживается фибронектин на эпителиальных клетках (Chen et al., 1977; Vesterinen et al., 1980, Yang et al., 1980). В случае небольшого количества фибронектина или какого-либо его присутствия на свежевыделенных гепатоцитах синтез фибронектина может быть индуцирован дексаметазаном (Marceau et al., 1980). В дополнение к утрате фибронектина, ассоциированного с трансформацией фибробластов (см. обзор Yamamada, Olden, 1978), действие протеаз, таких, как активатор плазминогена, усиливается (Unkeless et al., 1973). Прямо противоположно активатор плазминогена, но не фибронектина, присутствует на поверхности и секретируется в культивируемую среду как нормальными, так и злокачественными эпителиальными клетками в культуре (Williams et al., 1978; J. C. Yang et al., 1979; N. A. Yang et al., 1980). В дополнение, некоторые туморогенные карциноматозные линии экспрессируют заметное количество фибронектина (Nigley, Summerhayes, 1979).

Хотя результаты большинства исследований по изучению синтеза активатора плазминогена подчеркнули количественные различия, наблюдаемые между нормальными и злокачественными (или трансформированными) клетками, Wilson и соавт. (1980) продемонстрировали качественные различия в самих активаторах плазминогена. Особенно интересным было их наблюдение, установившее, что некоторые нормальные эпителиальные клетки человека имели энзим(ы), качественно сходный с таковым определенных опухолевых клеток. Подобным образом Recklies и соавт. (1980) обнаружили, что клетки злокачественной и незлокачественной опухолей молочной железы человека экспрессировали и секретировали коллагенолитическую активность. К сожалению, незлокачественные клетки были доброкачественными опухолями, а нормальные эпителиальные клетки не тестировались.

Остается только определить, могут или нет многочисленные параметры, описанные для трансформации фибробластов вирусами и другими агентами, быть применены к трансформации эпителиальных клеток.

6.7.3. Трансформирующие вирусы и биология клетки

Специалисты по биологии клетки должны осознать, что могут быть общие черты вирусной трансформации, вызванной рядом причин, но только не потенциальная туморогенность.

Вирусы, которые интегрируют свой геном (или его копию) в клеточную ДНК, становятся компонентом клетки и утилизируют клеточный аппарат. Такие вирус-инфицированные или трансформированные клетки являются полезными генетическими инструментами для изучения клеточной биологии. Исследования, направленные на изучение взаимодействия вирус—клетка в надежде выяснить молекулярные механизмы, вовлекаемые в трансформацию клетки, действительно обеспечили новое проникновение в молекулярную биологию клеток эукариотов. Например, процессинг гетерогенной ядерной РНК «сплайсингом» (см. обзор Crick, 1979; Flint, 1979), кепирование и полиаденилирование мРНК (Salditt-Georgieff et al., 1980; Shatkin, 1976) первоначально наблюдали у вирусов. Информация о деталях структуры хроматина и репликации была получена из исследований нуклеопротеиновых комплексов вируса (Beard, 1978; Cremisi, 1979; Felsenfeld, 1978; Muller et al., 1978). Появление рестрикционной эндонуклеазной технологии, которая первоначально была использована для анализа вирусных геномов (Kelly, Nathans, 1977a, b; Nathans, 1979), позволило применить ее для генетического картирования, клонирования и других исследований клеточных генов (Maniatis et al., 1978) и биологии развития (Dawid, Wahli, 1979). В дополнение убиквитарность и возможная интерференция эндогенно передающимися вирусами (Weiss, 1978) или трансдуцируемыми клеточными генами (Steffen et al., 1978) должны быть учтены при планировании экспериментов и интерпретации данных.

6.8. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Aaronson S. A., Anderson G. R., Dunn C. Y., Robbins K. C. (1974). Induction of type-CRNA virus by cycloheximide Increased expression of virus specific RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 3941—3945.

Abrahams P. J., Mulder C., Van De Voorde A., Warnaar S. O., Van der Eb A. J. (1975). Transformation of primary rat kidney cells by fragments of simian virus 40 DNA. J. Virol. 16, 818—823.

Air G. M. (1979). DNA sequencing of viral genomes. Compr. Virol. 13, 205—292.

Anderson G. R., Matovcik L. M. (1977). Expression of murine sarcoma virus genes in uninfected rat cells subjected to anaerobic stress. Science 197, 1371—1374.

Anderson J. L., Martin R. G., Chang C., Mora P. T., Livingston D. M. (1977). Nuclear preparations of SV40-transformed cells contain tumor-specific transplantation antigen activity. Virology 76, 420—425.

Aoki T., Walling M. J., Bushar G. S., Liu M., Hsu K. C. (1976). Natural antibodies in sera from healthy humans to antigens on surfaces of type C RNA viruses and cells from primates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2491—2495.

Arizpe H., Moyer M. P., Moyer R. C. (1981). Characteristics of monkey cells transfected with SV40 DNA fragments. In preparation.

Aviles D., Janri J., Rousset J. P., Ritz E. (1977). Tumor × host cell hybrids in the mouse: Chromosomes from the normal cell parent in malignant hybrid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 58, 1391—1399.

Axel R., Schlom J., Speigelman S. (1972). Presence in human breast cancer of RNA homologous to mouse mammary tumor virus RNA. Nature (London) 235, 32—36.
Bader A. V., Bader J. P. (1976). Transformation of cells by Rous sarcoma virus: Cytoplasmic vacuolization. J. Cell. Physiol. 87, 33—46.
Barrett J. C. (1980). A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells in culture. Cancer Res. 40, 91—94.
Barrett J. C., Crawford B. D., Mixter L. O., Schechtman L. M., Ts'o P. O. P., Pollack R. (1979). Correlation of in vitro growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. Cancer Res. 39, 1504—1510.
Basilico G., Gattoni S., Zouzias D., Valle G. D. (1979). Loss of integrated viral DNA sequences in polyoma-transformed cells is associated with an active viral A function. Cell 17, 645—649.
Beard P. (1978). Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40. Cell 15, 955—967.
Becker D., Kurth R., Critchley D., Friis R. R., Bauer H. (1977). Distinguishable transformation-defective phenotypes among temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. J. Virol. 21, 1042—1055.
Bendig M. M., Folk W. R. (1979). Deletion mutants of polyoma virus defining a non-essential region between the origin of replication and the initiation codon for early proteins. J. Virol. 32, 530—535.
Beug H., Claviez M., Jockusch B., Graf T. (1978). Differential expression of Rous sarcoma virus-specific transformation parameters in enucleated cells. Cell 14, 843—856.
Bishop J. M. (1978). Retroviruses. Annu. Rev. Biochem. 47, 35—88.
Bissell M. J, Hatie C., Calvin M. (1979). Is the product of the src gene a promoter? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 348—352.
Bister K., Yamamoto N., Zur Hausen H. (1979). Differential inducibility of Epstein-Barr virus in cloned, nonproducer Raji cells. Int. J. Cancer 23, 818—825.
Boone C. W. (1975). Malignant hemangioendotheliomas produced by subcutaneous inoculation of BALB/3T3 cells attached to gglass beads. Science 188, 68—70.
Boone C. W., Takeichi N., Eaton S. A., Paranjpe M (1979). Spontaneous neoplastic transformation in vitro: A form of foreign body (solid surface) tumorigenesis. Science 204, 177—179.
Botchan M., Topp W., Sambrook J. (1976). The arrangement of simian virus 40 sequences in the DNA of transformed cells. Cell 9, 269—287.
Botchan M., Topp W., Sambrook J. (1979). Studies on simian virus 40 excision from cellular chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 709—720.
Botchan M., Stringer J., Mitchison T., Sambrook J. (1980). Integration and excision of SV40 DNA from the chromosome of a transformed cell. Cell 20, 143—152.
Bouck N., Beales N., Shenk T., Berg P., di Mayorca G. (1978). New region of the simian virus 40 genome required for efficient viral transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2473—2477.
Boyd V. A. L., Butel J. (1972). Demonstration of infectious deoxyribonucleic acid in transformed cells. I. Recovery of simian virus 40 from yielder and nonyielder transformed cells. J. Virol. 10, 399—409.
Brugge J. S., Erikson R. L. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by avian sarcoma virus Nature (London) 269, 346—348.
Bukhari A. I. (1976). Bacteriophage Mu as a transpositional element. Annu. Rev. Ginet. 10, 389—420.
Calothy G., Pessac B. (1976). Growth stimulation of chick embryo neuroretinal cells infected with Rous sarcoma virus: Relationship to viral replication and morphological transformation. Virology 71, 336—345.
Camacho R., Spear P. G. (1978). Transformation of hamster embryo fibroblasts by a specific fragment of the herpes simplex virus genome. Cell 15, 993—1002.
Catala F., Vigier P. (1979). Infectivity of proviral DNA from avian sarcoma virus-transformed mammalian cells. J. Virol. 29, 833—839.
Chang C., Martin R. G., Livingston D. M., Lubrosky S. W., Hu C. P., Mora P. T. (1979a). Relationship between T-antigen and tumor-specific transplantation antigen in simian virus 40-transformed cells. J. Virol. 29, 69—75.

Chang C., Simmons D. T., Martin M. A., Mora P. T. (1979b). Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. J. Virol. **31**, 463—471.

Chen L. B., Gallimore P. H., McDougall J. K. (1976). Correlation between tumor induction and the large external transformation-sensitive protein on the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 3570—3574.

Chen L. B., Maitland R. H., Gallimore P. H., McDougall J. K. (1977). Detection of the large external transformation sensitive protein on some epithelial cells. Exp. Cell. Res. **106**, 39—46.

Chen L. B., Burridge K., Murray A., Walsh M. L., Copple C. D., Bushnell A. (1978). Modulation of cell surface glycocallyx studies on large, external transformation-sensitive protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. **312**, 366—381.

Clark J. M., Pateman J. A. (1978). Isolation method affects transformed cell line karyotype. Nature (London) 272, 262—264.

Coggin J. H., Jr. (1979). Induction of transplantation resistance with soluble simian virus 40-induced hamster tumor-specific transplantation antigen. Cancer Res. 39, 2952—2959.

Coggin J. H., Jr., Ambrose K. R. (1979). Embryonic and fetal determinants on virally and chemically induced tumors. Methods Cancer Res. 18, 371—389.

Cohen J. C., Varmus H. E. (1979). Endogenous mammary tumor virus DNA varies among wild mice and segregates during inbreeding. Nature (London) **278**, 418—423.

Collett M. S., Erickson R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcomavirus src gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2021—2024.

Collett M. S., Brugge J. S., Erikson R. L., Lau A. F., Kruzuzek R. A., Faras A. J. (1979a). The SRC gene product of transformed and morphologically reverted ASV-infected mammalian cells. Nature (London) **281**, 195—198.

Collett M. S., Erikson E., Purchio A. F., Brugge J. S., Erikson R. L. (1979b). A normal cell protein similar in structure and function to the avian sarcoma virus transforming gene product. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. **76**, 3159—3163.

Collins C. J., Boettiger D., Green T. L., Burgess M. B., Devlin B. H., Parsons J. T. (1980). Arrangement of integrated avian sarcoma virus DNA sequences within the cellular genomes of transformed and revertant mammalian cells. J. Virol. **33**, 760—768.

Cooper G. M., Temin H. M. (1976). Lack of infectivity of the endogenous avian leukosis virus-related genes in the DNA of uninfected chicken cells. J. Virol. **17**, 422—430.

Costa J., Yee C., Troost T., Rabson A. S. (1973). Effect of dexamethasone on herpes simplex virus type 2 infection in vitro. Nature (London) 252, 745—746.

Cremisi C. (1979). Chromatin replication revealed by studies of animal cells and papovaviruses (simian virus 40 and polyoma virus). Microbiol. Rev. **43**, 297—319.

Crick F. (1979). Split genes and RNA splicing. Science 204, 264—271.

Croce C. M., Koprowski H. (1974). Positive control of the transformed phenotype in hybrids between normal and SV40 transformed human cells. Science 184, 1288—1289.

Croce C. M., Koprowski H. (1978). The genetics of human cancer. Sci. Am. 238, 117—125.

Croce C., Aden D., Koprowski H. (1975). Tumorigenicity of mouse-human diploid hybrids in nude mice. Science. **190**, 1200—1202.

Dawid I. B., Wahli W. (1979). Application of recombinant DNA technology to questions of developmental biology : A review. Dev. Biol. 69, 305—328.

De The G. (1979). The epidemiology of Burkitt's lymphoma : Evidence for a causal association with Epstein—Barr virus. Epidemiol. Rev **1**, 32—54.

De The G., Geser A., Munoz N. (1976). Viruses and human neoplasia. In «Scientific Foundations of Oncology» (T. Symington and R. L. Carter, eds.), pp. 414—425. Heinemann, London; Year Book Publ., Chicago, Illinois.

Doerfler W. (1975). Integration of viral DNA into the host genome. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **71**, 1—78.

Doerffler W. (1977). Animal virus-host genome interactions Compr. Virol. **10**, 279—399.
Dudley J. P., Butel J. S. (1979). Effect of dexamethasone on expression of endogenous mouse mammary tumor virus sequences in BALB/c tumor cell lines. Virology **96**, 453—462.
Duesberg P. H., Vogt P. K. (1979). Avian acute leukemia viruses MC29 and MH2 share specific RNA sequences: Evidence for a second class of transforming genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **76**, 1633—1637.
Epstein M. A., Achong B. G., eds. (1980). «Aspects of Epstein — Barr Virus». Springer-Verlag, Berlin and New York.
Evenson D. P. (1977). Electron microscopy of viral nucleic acids. Methods Virol. **6**, 219—264.
Fareed G. C. and Davoli D. (1977). Molecular biology of papovaviruses. Annu. Rev. Biochem. **46**, 471—501.
Feller W. F., Chopra H. C. (1969). Studies of human milk in relation to the possible viral etiology of breast cancer. Cancer (Philadelphia) **24**, 1250—1254.
Felsenfeld G. (1978). Chromatin. Nature (London) **271**, 115—122.
Fiori M., di Mayorca G. (1976). Occurrence of BK virus DNA in DNA obtained from certain, human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 4662—4666.
Fleckenstein B. (1979). Oncogenic herpes viruses of non-human primates. Biochim. Biophys.Acta **560**, 301—342.
Flint J. (1977). The topography and transcription of the adenovirus genome. Cell **10**, 153—166.
Flint J. (1979). Spliced viral messenger RNA. Am. Sci. **67**, 300—311.
Fogel M. (1975). Polyoma virus-transformed rat cell lines inducible for viral capsid antigen synthesis. Virology **65**, 446—454.
Folk W. R. (1973). Induction of virus synthesis in polyomatransformed BHK-21 cells. J. Virol. **11**, 424—431.
Freedman V. H., Shin S. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. Cell **3**, 355—359.
Friis R. R., Schwarz R. T., Schmidt M. F. G. (1977). Phenotypes of Rous sarcoma virus-transformed dibroblasts : An argument for a multifunctional src gene product. Med. Microbiol. Immunol. **164**, 155—165.
Gallimore P. H., McDougall J. K., Chen L. B. (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. Cell **10**, 669—678.
Gee C. J., Harris H. (1979). Tumorigenicity of cells transformed by simian virus 40 and of hybrids between such cells and normal diploid cells. J. Cell Sci. **36**, 233—240.
Gelb L. D., Kohne D. E., Martin M. A. (1971). Quantitation of simian virus 40 sequences in African green monkey, mouse and virus-transformed cell genomes. J. Mol. Biol. **57**, 129—145.
Gershey E. L. (1979). Simian virus 40-host cell interaction during lytic infection. J. Virol. **30**, 76—83.
Giacherio D., Hager L. P. (1979). A poly(DT)-stimulated ATPase activity associated with simian virus 40 large T antigen. J. Biol. Chem. **254**, 8113—8116.
Gilbert S. F., Migeon B. R. (1975). D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. Cell **5**, 11—17.
Gilbert S. F., Migeon B. R. (1977). Renal enzymes in kidney cells selected by D-valine medium. J. Cell Physiol. **92**, 161—168.
Ginsberg H. S. (1979). Adenovirus structural proteins. Compr. Virol. **13**, 409—457.
Ginsberg H. S., Young C. S. H. (1977). Genetics of adenoviruses. Compr. Virol. **9**, 27—208.
Graf R., Beug H. (1978). Avian leukemia viruses. Interaction with their target cells in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta **516**, 269—300.
Graf T., Beug H., Hayman M. J. (1980). Target cell speci ficity of defective avian leukemia viruses : Hematopoietic target cells for a given virus type can be infected but not transformed by strains of a different type. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **77**, 389—393.
Graham F. L. (1977). Biological activity of tumor virus DNA Adv. Cancer Res. **25**, 1—51.

Graham F. L., Abrahams P. G., Mulder C., Heijneker H. L., Warnaar S. O., de Vries F. A. J-, Fiers S., van der Eb A. J. (1974). Studies on in vitro transformation by DNA andDNA fragments of human adenovirus and simian virus 40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**, 637—650.
Gunthert U., Schweiger M., Stupp M., Doerfler W. (1976). DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells, and host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 3923—3927.
Gurney E. G., Gurney T. (1979). Density-dependent inhibition of both growth and T antigen expression in revertants isolated from simian virus 40-transformed mouse SVT2 cells. J. Virol. 32, 661—671.
Halpern C. C., Hayward W. S., Hanafusa H. (1979). Characterization of some isolates of newly recovered avian sarcoma virus. J. Virol. **29**, 91—101.
Hanafusa H. C. (1977). Cell transformation by RNA tumor viruses. Compr. Virol. **10**, 401—420.
Hanafusa H. C., Halpern C., Buchhagen D. C., Kawai S. (1977). Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants. J. Exp. Med. **146**, 1735—1737.
Henle W. and Henle G. (1972). Epstein — Barr virus: The cause of infections mononucleosis. In «Oncogenesis and Herpesviruses.» Sci. Publ. N 2, p. 269, IARC, Lyon.
Herbrink P., Moen J. E. T., Brouwer J., Warnaar S. O. (1980). Detection of antibodies cross-reactive with type C RNA tumor viral p30 protein in human sera and exudate fluids. Cancer Res. **40**, 166—173.
Heston W. E. (1975). Genetics: Animal tumors. In «Cancer Etiology: Chemical and Physical Carcinogenesis» (F. F. Becker, ed.), pp. 33—57. Plenum, New York.
Hill M., Hillova J. (1974). RNA and DNA forms of the genetic material of C-type viruses and the integrated state of the DNA form in the cellular chromosomes, Biochim. Biophys. Acta **355**, 7—39.
Hiscott J. B., Defendi V. (1979). Simian virus 40 gene A regulation of cellular DNA synthesis. I. In permissive cell. J. Virol. **30**, 590—599.
Huebner R. J., Todaro G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **64**, 1087—1094.
Hynes R. O. (1976). Cell surface proteins and malignant transformation. Biochim. Biophys. Acta 458, 73—107.
Icekson I., Yaniv M. (1979). Effects of cytosol on transcription in isolated simian-virus-40-infected nuclei. Eur. J. Biochem. **95**, 377—382.
Ito Y. (1979). Polyoma virus-specific 55K protein isolated from plasma membrane of productively infected cells in virus-coded and important for cell transformation. Virology 98, 261—266.
Jaenisch R. (1980). Retroviruses and embryogenesis: Microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos. Cell **19**, 181—188.
Jeeves W. P., Rainbow A. J. (1979). Gamma-ray enhanced reactivation of gamma-irradiated adenovirus in human cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **90**, 567—574.
Jonasson J., Harris H. (1977). The analysis of malignancy of cell fusion. VIII. Evidence for the intervention of an extra chromosomal element. J. Cell Sci. **24**, 255—264.
Jonasson J. Povey S., Harris H. (1977). The analysis of malignancy by cell fusion. VII. Cytogenetic analysis of hybrids between malignant and diploid cells and of tumors derived from them. J. Cell Sci. **24**, 217—254.
Kaplan J., C., Wilbert S. M., Collins J. J., Rakusanova T., Zamansky G. B., Black P. H. (1975). Isolation of simian virus 40-transformed inbred hamster cell lines heterogeneous for virus induction by chemicals or radiation. Virology 68, 200—214.
Kelley S., Bender M. A. R., Brockman W. W. (1980). Transformation of BALB/c-3T3 cells by tsA mutants of simian virus 40: Effect of transformation technique on the transformed phenotype. J. Virol. **33**, 550—552.
Kelly T. J., Nathans D. (1977a). The genome of simian virus 40. Adv. Virus Res, **21**, 86—174.

Kelly T. J., Nathans D. (1977b). The genome of simian virus 40. Annu. Rev. Genet. 11, 85—173.
Keydar J., Gilead Z., Karby S., Harel E. (1973). Production of virus by embryonic cultures cocultivated with breast tumor cells or infected with milk from breast cancer patients. Nature (London), New Biol. 241, 49—52.
Kiessling A. A. and Goulian M. (1979). Detection of reverse transcriptase activity in human cells. Cancer Res. 39, 2062—2069.
Kucherlapati R., Shin S. (1979). Genetic control of tumorigenicity in interspecific mammalian cell hybrids. Cell 16, 639—648.
Kucherlapati T., Hwang S. P., Shimizu N., McDougall J. K., Rotchan M. R. (1978). Another chromosomal assignment for a simian virus 40 integration site in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 4460—4464.
Kurth R., Teich N. M., Weiss R., Oliver R. T. (1977). Natural human antibodies reactive with primate type C viral antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 1237—1242.
Laik C. J., Goldman N. D., Khoury G. (1979). Functional similarity between the early antigens of simian virus 40 and human papovavirus BK. J. Virol. 30, 141—147.
Lau A. F., Kryzek R. A., Brugge J. S., Erikson R. L., Scholimeyer J., Faras A. J. (1979). Morphological revertants of an avian sarcoma virus transformed mammalian cell lines exhibit tumorigenicity and contain pp60 src. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 3904—3908.
Laufs R., Steinke H. (1975). Vaccination of non-human primates against malignant lymphoma. Nature (London) 253, 71—74.
Lavialle C., Suarez H. G., Morris A. G., Cassingena R. (1978). Induction of infectious virus DNA and virus particles by mitomycin C in SV40-transformed mouse cells. J. Gen. Virol. 41, 201—205.
Ledinko N., Schaeufele J., Sooma O. (1979). Adenovirus type 12 gene 401 function and maintenance of transformation. J. Virol. 29, 250—260.
Leffert H. L., Paul D. (1972). Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. J. Cell Biol. 52, 559—568.
Levinson A. D., Oppermann H., Levintow L., Varmus H. E., Bishop J. M. (1978). Evidence that the fransforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. Cell 15, 561—572.
Lin E. S., Schmidt-Ulrich R. and Wallach D. F. H. (1977). Transformation by simian virus 40 induces virus-specific related antigens in the surface membrane and nuclear envelope. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 2495—2499.
Linzer D. I. H., Levine A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV-40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17, 43—52.
Lipotich G., Moyer M. P., Moyer R. C. (1980). Rescue of SV40 following transfection of TC7 cells with celluar DNAs containing complete and partial SV40 genomes. Mol. Gen. Genet. (in press).
Lowry D. R., Rowe W. P., Teich N., Hartley J. E. (1971). Murine leikemia virus: High frequency activation in vitro 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. Science 174, 155—156.
Luria S. E., Darnell J. E., Baltimore D., Campbell A. (1978). «General Virology.» Wiley, New York.
McAllister R. M., Guilden R. V., Green M. (1972). Adenoviruses in human cancer. Lancet i, 831—834.
McCutchan T., Singer M., Rosenberg M. (1979). Structure of simian virus 40 recombinants that contain both host and viral DNA sequences. II. The structure of variant 1103 and its comparison to variant CVP8/1/P2 (EcoRI Res.). J. Biol. Chem. 254, 3592—3597.
Magrath I. T., Pizzo P. A., Novikovs L., Levine A. S. (1979). Enhancement of Epstein—Barr virus replication in producer cell lines by a combination of low temperature and corticosteroids. Virology 97, 477—481.
Maniatis T., Hardison R. C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim S. K., Efstatiadis A. (1978). The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. Cell 15, 687—701.

Mainly K. R., Buffett R. F. (1979). Differences in pathogenicity among cloned sublines of a murine leikemia virus. J. Virol. **30**, 232—240.
Marceau N., Goyette R., Valet J. P., Descheves J. (1980). The effect of dexamethasone on formation of a fibronectin extracellular matrix by rat hepatocytes in vitro. Exp. Cell. Res. **125**, 497—502.
Martin R. G., Setlow V. P., Edwards C. A. F., Vembu D. (1979a). The roles of the simian virus 40 tumor antigens in transformation of Chinese hamster lung cells. Cell **17**, 635—643.
Martin R. G., Setlow V. P., Edwards C. A. F. (1979b). Roles of the Simian Virus 40 tumor antigens in transformation of Chinese hamster lung cells: Studies with simian virus 40 double mutants. J. Virol. **31**, 596—607.
Mather J. P., Sato G. H. (1979). The use hormone-supplemented serum free media in primary cultures. Exp. Cell Res. **124**, 215—221.
Melendez L. V., Daniel M. D., Hunt R. D., Fraser C. E. O., Garcia F. G., King N. W., Williamson M. E. (1970). Herpes virus saimiri: V. Further evidence to consider this virus as the etiological agent of a lethal disease in primates which resembles a malignant lymphoma. J. Natl. Cancer Inst. **44**, 1175.
Melero J. A., Stitt D. T., Mangel W. F., Carroll R. B. (1979). Identification of new polypeptide species (48—55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and transformed cells. Virology **93**, 466—480.
Melero J. A., Tur S., Carrol R. B. (1980). Host niclear proteins expressed in simian virus 40-transformed and infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **77**, 97—101.
Miskin R., Reich E. (1980). Plasminogen activator: Induction of synthesis by DNA damage. Cell **19**, 217—224.
Morhenn V., Rabinowitz Z., Godon T. M. (1973). Effects of adrenal glucocorticoids on polyoma virus replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 1088—1089.
Moss R. S., Honeycutt N., Pawson T., Martin G. W. (1979). Viral transformation of chick myogenic cells. The relationship between differentiation and the expression of the src gene. Exp. Cell Res. **123**, 95—105.
Moyer M. P. (1979). The association of DNA and RNA with membranes Int. Rev. Cyt. **61**, 1—62.
Moyer M. P., Moyer R. C. (1979). Subculture requirement for rescue of SV40 from «nonrescuable» cell lines. Intervirology **12**, 89—95.
Moyer M. P., Arizpe H., Pierson K., Sosa A., Moyer R. C. (1979). SV40 DNA transformed cells and tumorigenesis. Tex. J. Sci. **31**, Suppl. N 5, 19—32.
Moyer M. P., Fey V., Moyer R. C. (1980). In preparation.
Moyer M. P., Arizpe H., Pierson K., Sosa A., Moyer R. C. (1981a). Tumorigenesis in hamsters of xenogeneic cells possessing complete and partial genomes of SV40. Submitted.
Moyer M. P., Fey V., Moyer R. C. (1981b). The inability of tumorigenic hamster cells to induce tumors upon fusion with normal monkey cells or monkey cells containing SV40 DNA fragments. In preparation.
Moyer M. P., Pierson K., Sosa A., Moyer R. C. (1981c). Lack of timorigenicity of defined early region subgenomes of SV40. In preparation.
Moyer M. P., Pierson K., Waite M. R. F., Sosa A., Moyer R. C. (1981d). Transformation of primate, canine, equine, avian and muntjak cells with papovaviruses and papovavirus DNA. In preparation.
Moyer R. C., Moyer M. P., Gerodetti M. H. (1977). Neoplastic transformation of permissive monkey cells by subgenomic fragments of SV40 DNA and rescue of SV40 virions from transformed cells by cell fusion Proc. Int. Symp. Detect. Prev. Cancer, 3rd 2, 1443—1464.
Moyer R. C., Moyer M. P., Gerodetti M. H. (1978). Rescue of infectious virus from permissive monkey cells containing simian virus 40 DNA fragments. J. Virol. **26**, 272—280.
Muller U., Zentgraf H., Eicken I., Keller W. (1978). Higher order structure of simian virus 40 chromatin. Science **201**, 406—415.
Nash H. A. (1977). Integration and excision of bacteriophage. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 78, 174—199.

Nathans D. (1979). Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics. Science **206**, 903—909.
Newell N., Shah K. V., Kelly T. J., Jr. (1979). Evolutionary relationships of the primate papovaviruses: Base sequence homology among the genomes of simian vurus 40, stump tailed macaque virus, and SA12 vurus. J. Virol. 30, 624—636.
Nicolson C. L., (1976). Trans membrane control of the receptors on normal and tumor cells. Biochim. Biophys. Acta **458**, 1—72.
Nishiyama Y., Rapp F. (1979). Regulation of persistent infection with herpes simplex virus in vitro by hydrocortisone. J. Virol. 31, 841—844.
Ohno T., Spiegelman S. (1977). Antigenic relatedness of the DNA polymerase of human breast cancer particles to the enzyme of the Mason-Pfizer monkey virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74**, 2144—2148.
Okada Y. S., Kahura A. (1979). Cell cycle dependence of transformation expression in mouse cells transformed by a thermosensitive mutant (ts 121) of polyoma virus. J. Cell Physiol. 100, 262—272.
Orth C., Jeanteur P., Croissant O. (1971). Evidence for and localization of vegetative viral DNA replication by autoradiographic detection of RNA—DNA hybrids in sections of tumors induced by Shope papilloma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **68**, 1876—1880.
Ozer H. L., Jha K. K. (1975). Malignancy and transformation expression in somatic cell hybrids and variants. Adv. Cancer Res. 25, 53—94.
Panem S., Ordonez N. C., Kirsten W. H., Katz A. I., Spargo B. H. (1976). C-type virus expression in systemic lupus erythematosus N. Engl. J. Med. **295**, 470.
Paran M., Gallo R. C., Richardson L. S. Wu A. M. (1973). Adrenal corticosteroids enhance prodiction of type-C virus induced by 5-iodo-2'-deoxyuridine from cultured mouse fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 2391—2395.
Pollack R., Risser R., Conton S., Freedman U., Shin S. I., Rifkin D. B. (1975). Production of plasminogen activator and colonial growth in semisolid medium are in vitro correlates of tumorigenicity in the immune deficient nude mouse. In «Protease and Biological Control» (D. Rifkin, E. Reich and E. Shaw, eds.), Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Ponten J. (1971). «Spontaneous and Virus-Induced Transformation in Cell Culture». Springer-Verlag, Berlin and New York.
Ponten J. (1976). The relationship between in vitro transformation and tumor formation in vivo. Biochim. Biophys. Acta 458, 397—422.
Poste G., Flood M. K. (1979). Cells transformed by temperature sensitive mutants of avian sarcoma virus cause tumors in vivo at permissive and nonpermissive temperatures Cell **17**, 789—800.
Potter C. W. (1979). Some aspects of the role viruses in cancer. Postgrad. Med. J. 55, 150—158.
Prasad I., Zouzias D., Basilico C. (1976). State of the viral DNA in rat cells transformed by polyoma virus. I. Virus rescue and the presence of nonintegrated viral DNA. J. Virol. **18**, 436—444.
Price F. M., Camalier R. F., Gantt R., Taylor W. G., Smith G. H., Sanford K. K. (1980). A new culture medium for human skin epithelial cells. In Vitro **16**, 147—158.
Pringle C. R. (1977). Enucleation as a technique in the study of virushost interaction. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **76**, 49—82.
Prochownik E. V., Panem S., Kristen W. H. (1976). Induction of type-C virions from normal rat kidney cells by 2-deoxy-D-glucose. J. Virol. **17**, 219—226.
Purchase H. G. (1972). Recent advances in the knowledge of Marek's disease. Adv. Vet. Sci. Comp. Sci. 16, 223—230.
Purchase H. G., Witter R. L., Okazaki W., Burmester B. R. (1971). Vaccination against Marek's disease. Perspect. Virol. 7, 91—101.
Purchase H. G., Okazaki W., Vogt P. K., Hanafusa H., Burmester B. R., Crittenden L. B. (1977). Oncogenicity of avian leukosis viruses of different subgroups and mutants of sarcoma viruses. Infect. Immun. **15**, 423—428.
Purchio A. F., Erikson E., Erikson R. L. (1977). Translation of 35S and of subgenomic regions of avian sarsoma virus RNA. Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A. 74, 4661—4665.
Rakusanova T., Kaplan J. C., Smales W. P., Black P. H. (1976). Excision of viral

DNA from host cell DNA after induction of simian virus 40 transformed hamster cells. J. Virol. 19, 279—285.
Rapp F., Westmoreland D. (1976). Cell transformation by DNA-containing viruses. Biochim. Biophys. Acta 458, 167—211.
Rascati R. J., Tennant R. W. (1979). Involvement of DNA damage in hydroxyurea-mediated induction of endogenous murine retrovirus. Virology 94, 273—281.
Rassoulzadegan M., Cuzin F. (1980). Transformation of rat fibroblastic cells with early mutants of polyoma (tsa) and simian virus 40 (tsA30): Occurrence of either A or N transformants depends on the multiplicity of infection. J. Virol. 33, 909—911.
Rassoulzadegan M., Perbal B., Cuzin F. (1978a). Growth control in simian virus 40-transformed rat cells: Temperature-independent expression of the transformed phenotype in tsa transformants derived by agar selection. J. Virol. 28, 1.
Rassoulzadegan M., Seif R., Cuzin R. (1978b). Conditions leading to the establishment of the N (a gene dependent) and A (a gene independent) transformed states after polyoma virus infection of rat fibroblasts. J. Virol. 28, 421—426.
Recklies A. D., Tiltman K. J., Stoker T. A. M., Poole A. R. (1980). Secretion of proteinases from malignant and non-malignant human breast tissue. Canser Res. 40, 550—556.
Reedman B. M., Klein G. (1973). Cellular localization of an Epstein—Barr virus-associated complement fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. Int. J. Cancer 11, 499—520.
Reid L. M., Jones C. L., Holland J. (1979). Virus carrier state suppresses tumorigenicity of timor cells in athymic (nude) mice. J. Gen. Virol. 42, 609—614.
Rifkin D., Loeb J. N., Moore G., Reich E. (1974). Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures. J. Exp. Med. 139, 1217—1328.
Righthand V. F. (1974). Enhancement of simian virus 40 infection in simian and human cells by permissive cell extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146, 1014—1020.
Ringertz N. R., Savage R. E. (1976). «Cell Hybrids.» Academic Press, New York.
Robins T., Duesberg P. (1979). Specific RNA sequences of Rous sarcoma virus (RSV) recovered from tumors induced by transformation-defective RSV deletion mutants. Virology 93, 427—434.
Roizman B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes (review). Cell 16, 481—494.
Royer-Pokora B., Beug H., Claviez M., Winkhardt H. J., Friis R. R., Graf T. (1978). Transformation parameters in chicken fibroblasts transformed by AEV and MC29 avian leikemia viruses. Cell 13, 751—760.
Salditt-Georgieff M., Harpold M., Chen Kiang S., Darnell J. E., Jr. (1980). The addition of 5'cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped. Cell 19, 69—78.
Sawada Y., Ojima S., Shimojo H., Shiroki K., Fujinaga K. (1979). Transforming DNA sequences in rat cells transformed by DNA fragments of highly oncogenic human adenovirus type 12, J. Virol. 32, 379—385.
Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H. (1978). Membrane proteins of cells neoplastically transformed by simian virus 40. Prog. Exp. Tumor Res. 22, 151.
Seif R., Cuzin F. (1977). Temperature-sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced by the tsA mutant of polyoma virus. J. Virol. 24, 721—728.
Seif R., Martin R. G. (1979). Growth state of the cell early after infection with simian virus 40 determines whether the maintenance of transformation will be A-gene dependent or independent. J. Virol. 31, 350—359.
Shatkin A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. Cell 9, 645—653.
Shillitoe E. J., Silverman S. (1979). Oral cancer and herpes simplex virus — A review Oral Surg. Oral Med., Oral Pathol, 48, 216—224.
Shin S., Freedman V. H., Risser R., Pollack R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 4435—4439.
Shiroki K., Shimojo H., Maeta Y., Hamada C. (1979a). Tumor-specific transplantation and surface antigen in cells transformed by the adenovirus 12 DNA fragments. Virology 99, 188—191.

Shiroki K., Shimojo H., Sawada Y., Uemizu Y., Fujinaga K. (1979b). Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA. Virology 95, 127—136.
Shkolnik T., Sachs L. (1978). Suppression of the in vivo malignancy and in vitro cell multiplication of myeloid leukemic cells by hybridization with normal macrophages. Exp. Cell Res. 113, 197—204.
Sidebottom E. (1980). The analysis of malignancy by cell fusion. In Vitro 16, 77—86.
Sleigh M. J., Topp W. C., Hanich R., Sambrook J. (1978). Mutants of simian virus 40 with an altered smallt protein are reduced in their ability to transform cells. Cell 14, 79—88.
Smith R. G., Nooter K., Rentvelzen P., Robert-Guroff M., Harewood K., Reitz M. S., Lee S. A., Gallo R. C. (1979). Characterization of a type-C virus produced by co-cultures of human leukemic bone-marrow and fetal canine thymus cells. Int. J. Cancer 24, 210—217.
Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503—518.
Stanbridge E. J. (1976). Suppression of malignancy in human cells. Nature (London) 260, 17—21.
Stanbridge E. J., Wilkinson J. (1978). Analysis of malignancy in human cells: Malignant and transformed phenotypes are under separate genetic control. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 1466—1469.
Steffen D., Anderson P., Goldfarb M., Weinberg R. A. (1978). Integration and possible transduction by retroviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 875—879.
Steimer K., Boettinger D. (1977). Complementation rescue of Rous sarcoma virus from transformed mammalian cells by polyethylene glycol-mediated cell fusion. J. Virol. 23, 133—141.
Steinberg B., Pollack R., Topp W., Botchan M. (1978). Isolation and characterization of T antigen-negative revertants from a line of transformed rat cells containing one copy of the SV40 genome. Cell 13, 19—32.
Stephenson J. R., Devare S. G., Reynolds F. H. (1978). Translational products of type-C RNA tumor viruses. Adv. Cancer Res. 27, 1—53.
Sutter D., Westphal M., Doerfler W. (1978). Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. Cell 14, 569—585.
Taylor A. L. (1963). Bacteriophage-induced mutation in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 50, 1043—1051.
Teich N., Weiss R. A., Salahuddin S. F., Gallagher R. E., Gillespie D. H., Gallo R. C. (1975). Infective transmission and characterization of a C-type virus released by cultured human myeloid leukemia cells. Nature (London) 256, 551—555.
Temin H. M. (1971). Mechanism of cell transformation by RNA tumor viruses. Annu. Rev. Microbiol. 25, 609—648.
Todaro G. J. (1978). RNA tumor virus genes and the transformating genes: Genetic transmission, infections spread and modes of expression. J. Natl. Cancer Inst., Monogr. 48, 190—196.
Todaro G. J., Huebner R. J. (1972). The viral oncogene hypothesis: New evidence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1009—1015.
Toniolo D., Basilico C. (1975). SV40 transformed cells with a temperature dependent serum requirement. Cell 4, 225—262.
Tooze J. (1973). «The Molecular Biology of Tumor Viruses». Cold Spring Harbor Lab.. Cold Spring Harbor, New York.
Unkeless J. C., Tobia A., Ossowski L., Quigley J. P., Rifkin D. B., Reich E. (1973). An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. I. Chick embryo fibroblast cultures transformated by avian RNA tumor viruses. J. Exp. Med. 137, 85—111.
Van Zanne D., Bloemers H. P. J. (1978). The genome of the mammalian sarcoma viruses. Biochim. Biophys. Acta 516, 249—268.
Varnier O. E., Levy J. A. (1979). Differential effect of dexamethasone on replication of ecotropic and xenotropic mouse type-C viruses. Virology 96, 604—614.
Vesterinen E. H., Nedrud J. C., Collier A. M., Walton L. A., Pagano J. S. (1980).

Explantation and subculture of epithelial cells from human uterine ectocervix. Cancer Res. **40**, 512—518.
Vignier R., Breitman M. L., Moscovici C., Vogt P. K. (1979). Restitution of fibroblast-transforming ability in SRC deletion mutants of avian sarcoma virus during animal passage. Virology **93**, 413—426.
Vogel A., Risser R., Pollack R. (1973). Isolation and characterization of revertant cell lines. III. Isolation of density-revertants of SV40-transformed 3T3 cells using colchicine. J. Cell. Physiol. **83**, 181—188.
Vogt P. K. (1977). Genetics of RNA tumor viruses Compr. Virol. **9**, 341—455.
Wang L. H., Halpern C. C., Nadel M., Hanafusa H. (1978). Recombination between viral and cellular sequences generated transforming sarcoma virus. Virology 83, 444—448.
Wang L. H., Moscovici C., Karess R. E., Hanafusa H. (1979). Analysis of the src gene of sarcoma viruses generated by recombination between transformation-defective mutants and quail cellular sequences. J. Virol. 32, 546—556.
Watkins J. F. (1975). The SV40 rescue problem. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**, 355—362.
Watkins J. F., Dulbecco R. (1967). Production of SV40 virus in heterokaryons of transformed and susceptible cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 58, 1396.
Weber M. J., Friis R. F. (1979). Dissociation of transformation parameters using temperature-conditional mutants of Rous sarcoma virus. Cell **16**, 25—32.
Weil R. (1978). Viral «tumor antigens:» A novel type of mammalian regulator protein. Biochim. Biophys. Acta 516, 310—388.
Weiss R. A. (1975). Genetic transmission of RNA tumor viruses. Perspect. Virol. 9, 165—205.
Weiss R. A. (1978). Why cell biologists should be aware of genetically transmitted viruses. J. Natl. Cancer Inst. 48, 183—189.
White M. T., Hu A.S. L., Hamamoto S. T., Nandi S. (1978). In vitro analysis of proliferating epithelial cell populations from the mouse mammary gland. In Vitro **14**, 271—281.
Wigley C. B., Summerhayes I. C. (1979). Loss of LETS protein is not a marker for salivary gland or bladder epithelial cell transformation. Exp. Cell Res. **118**, 394—398.
Williams G. M., Bermudez E., San R. H. C., Goldblatt P. J., Laspia M. F. (1978). Rat hepatocyte primary cultures. IV. Maintenance in defined medium in the role of production of plasminogen activator and other proteases. In Vitr **14**, 827—837.
Willingham M. C., Jay G., Pastan I. (1979). Localization of the ASV SRC gene product of the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. Cell **18**, 125—134.
Wilson E. L., Becker M. I. B., Hoal E. G., Dowdle E. G. (1980). Molecular species of plasminogen activators secreted by normal and neoplastic human cells. Cancer Res. **40**, 933—938.
Witkin E. W. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. **40**, 869—907.
Wold W. S. M., Mackey J. K., Brackmann K. H., Takemori N., Rigden P., Green M. (1978). Analysis of human tumors and human malignant cell lines for BK virus-specific DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **75**, 454—458.
Yamada K. M., Olden K. (1978). Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature (London) **275**, 179—185.
Yang N. A., Kirkland W., Jorgensen T., Furmanslei P. (1980). Absence of fibronectin and presence of plasminogen activator in both normal and malignant human mammary epithelial cells in culture. J. Cell Biol. **84**, 120—130.
Yang Y. C., Hearing P., Rundell K. (1979). Cellular proteins associated with simian virus 40 early gene products in newly infected cells. J. Virol. **32**, 147—154.
Yoshikura H., Yoshida M. (1978). Intracellular restriction of ecotropic murine leukemia virus in rat NRK cells and its abolishment by adaptation J. Virol. **27**, 612—618.
Zhdanov V. M. (1977). Transfection methods. Methods Virol. **7**, 283—321.
Zouzias D., Prasad I., Basilico C. (1977). State of the viral DNA in rat cells transformed by polyoma virus. II. Identification of the cells containing nonintegrated viral DNA and the effect of viral mutations. J. Virol. **24**, 142—150.

7

УЧАСТИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ТРАНСФОРМАЦИИ

Кедар Н. Прасад

7.1. Введение 222
7.2. Низкий уровень циклических нуклеотидов в трансформированных клетках 223
7.2.1. Саркома 223
7.2.2. Гепатома 223
7.2.3. Карцинома 223
7.3. Высокий уровень циклических нуклетоидов в трансформированных клетках 224
7.3.1. Опухоли молочных желез 224
7.3.2. Гепатома 225
7.3.3. Адренокортикальная карцинома 225
7.4. Циклические нуклеотиды и экспрессия нормального фенотипа в трансформированных клетках 225
7.4.1. Нейробластома 225
7.4.2. Глиома 226
7.4.3. Саркома 227
7.4.4. Клетки яичника китайского хомячка 227
7.4.5. Мышечные клетки 227
7.4.6. Меланома и овсяноклеточная карцинома 227
7.4.7. Другие типы клеток 228
7.5. Циклические нуклеотиды и рост трансформированных клеток . . 228
7.5.1. Опухоли молочных желез 228
7.5.2. Гепатома 228
7.5.3. Эпителиальные опухоли 229
7.5.4. Другие опухоли 229
7.5.5. Нормальные фибробласты 229
7.6. Аденилатциклаза в трансформированных клетках 229
7.6.1. Куриные эмбриональные фибробласты 230
7.6.2. Клетки почки крысы 231
7.6.3. Мышиные эмбриональные фибробласты 231
7.6.4. Карцинома 232

7.7. Аденилатциклаза в дифференцированных трансформированных клетках 232
7.7.1. Нейробластома 232
7.8. Циклонуклеотидфосфодиэстераза в трансформированных клетках 233
7.8.1. Нейробластома 233
7.8.2. Лейкоз и лимфома 234
7.8.3. Саркома 235
7.8.4. Гепатома 235
7.8.5. Опухоли молочных желез 235
7.9. Циклонуклеотид-связывающие белки и циклонуклеотид-зависимые протеинкиназы в трансформированных клетках 236
7.10. Роль цАМФ-связывающих белков в переживании и росте 236
7.10.1. Лимфома 236
7.10.2. Гепатома 236
7.10.3. Саркома 237
7.10.4. Опухоли молочных желез 237
7.10.5. Опухоли коры надпочечников 238
7.10.6. Другие опухоли 238
7.11. Возможное участие цАМФ-связывающих белков в малигнизации 238
7.12. Регуляция цАМФ-связывающих белков 239
7.13. Значение цАМФ-связывающих белков 240
7.14. Фосфопротеинфосфатаза в трансформированных клетках 241
7.15. Заключение 241
7.16. Указатель литературы 243

7.1. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы участие циклических нуклеотидов в трансформации и малигнизации изучалось как in vitro, так и in vivo. Для исследования этой проблемы были использованы два подхода. Первый подход включает индукцию дифференцировки уже трансформированных клеток путем повышения внутриклеточных уровней 3,5-цАМФ и последующие определения биохимических и морфологических изменений, связанных с дифференцировкой. Дифференцировка, индуцированная цАМФ, может быть обратимой или необратимой в зависимости от типа клеток, клона и условий эксперимента. Для определения возможных дефектов цАМФ-системы использовали цАМФ-резистентные трансформированные клетки. Другой подход заключается в изучении изменения сдвигов в системе циклических нуклеотидов в клетках, подвергшихся вирусной, химической или спонтанной трансформации, по сравнению с нормальным контролем. Изменения циклических нуклеотидов в системах in vivo имеют неопределенный характер по причине смешения разных типов клеток, а также быстрого разрушения свободных циклических нуклеотидов циклонуклеотид — фосфодиэстеразой. Кроме того, уровни некоторых параметров системы циклических нуклеотидов зависят от плотности клеточной популяции. Последняя в опухолевых тканях in vivo варьирует в зависимости от стадии опухолевого процесса и участка опухоли (периферическая ткань может быть относительно

менее плотной и расти быстрее по сравнению с центральными участками, в которых может наблюдаться некроз). Это необходимо учитывать при оценке значения изменений системы циклических нуклеотидов в трансформации клеток in vivo.

На основании ранее опубликованных результатов можно сказать, что не существует унифицированной функции циклических нуклеотидов в трансформации. Их возможная роль зависит от типа клеток. Наиболее обширные исследования были проведены на фибробластах и нейробластоме, хотя опубликовано значительное число работ по клеткам яичника китайского хомячка, гепатомы и другим клеткам. Задача настоящего обзора — обсудить данные о роли циклических нуклеотидов в трансформации клеток млекопитающих с целью сделать определенное заключение, а также поставить вопросы для дальнейшего изучения.

7.2. НИЗКИЙ УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Низкий внутриклеточный уровень цАМФ ассоциирован с трансформированным состоянием следующих типов клеток.

7.2.1. Саркома

Некоторые типы фибробластов, трансформированных вирусами и химическими канцерогенами, характеризуются сниженным внутриклеточным уровнем цАМФ по сравнению с нормальными фибробластами в культуре (Pastan, Tohnson, 1974; Ryan, Heidrick, 1974; Pastan et al., 1975; Chalapowski et al., 1975). Снижение уровня цАМФ и повышение уровня цГМФ по сравнению с нормальной тканью простаты наблюдалось в фибросаркоме крыс, индуцированной 20-метилхолантреном (Shima et al., 1976).

7.2.2. Гепатома

Уровень цАМФ был снижен в гепатоме Морриса (Hickie et al., 1974). При регенерации печени уровень цАМФ вначале резко падал, затем наблюдалось его двухфазное повышение, тогда как уровень цГМФ оставался постоянным (Fausto, Butcher, 1976). В культивируемых клетках быстрорастущей гепатомы отмечен высокий уровень цГМФ, тогда как в клетках нормальной печени уровень цАМФ был ниже наблюдаемого или равен последнему (Goldberg et al., 1975).

7.2.3. Карцинома

Сниженный по сравнению с нормальным контролем уровень цАМФ отмечался в индуцированных асбестом опухолевой ткани перитонеальной мезотелиомы крыс (Stevens et al., 1979), Х-лучами аденокарциноме кишечника крыс (Stevens et al., 1976), 1,2-диметил-

гидразином аденокарциномах тонкого и толстого кишечника крысы (Stevens et al., 1978), а также аденокарциноме человека (De Rubertis et al., 1976). Существенные изменения уровня цГМФ в этих тканях отсутствовали. Развивающаяся опухоль кожи, индуцированная 9,10-диметил-1,2-бензантраценом, характеризовалась повышенным уровнем цГМФ и сниженным уровнем цАМФ; инъекции дибутирил-цАМФ и L-dopa приводили к полной регрессии кожных опухолей у 20 % животных (Busse et al., 1979).

7.3. ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Некоторые типы опухолевых тканей in vivo характеризуются повышенным уровнем цАМФ. Обширный обзор по этому вопросу опубликован Ryan, Heidrick (1974). Ниже приведены некоторые примеры.

7.3.1. Опухоли молочных желез

Повышенные уровни цАМФ были обнаружены в ДМБА-индуцированных опухолях молочных желез крыс (Minton et al., 1976) и опухолях молочных желез человека (Minton et al., 1974). Для некоторых опухолей наблюдаемые изменения уровня цАМФ зависят от методики опыта и способа обработки результатов измерения. Например, уровни цАМФ и цГМФ были существенно повышены в неопластической ткани молочной железы человека, если содержание этих нуклеотидов рассчитывали на единицу массы ткани или на единицу массы клеточного белка (Minton et al., 1974). Однако в расчете на клетку неопластическая ткань характеризовалась сниженным уровнем циклических нуклеотидов по сравнению с нормальной (Kung et al., 1977). В ДМБА-индуцированных опухолях молочных желез крыс было обнаружено повышение содержания цАМФ, приходящееся на единицу массы сырой ткани и на единицу массы белка, тогда как в расчете на единицу массы ДНК содержание цАМФ не отличалось от нормы (Matusik, Hiff, 1976). Cohen, Chan (1975) показали, что уровень цАМФ повышен в ткани ДМБА-индуцированных опухолей молочных желез крыс, но снижен в культивируемых клетках этих опухолей. В этой работе результаты, полученные для культур клеток, были рассчитаны на единицу массы клеточного белка, тогда как результаты, полученные для опухолевой ткани in vivo,— на единицу массы сырой ткани. По данным Rillema и соавт. (1978), уровень цАМФ в аналогичных опухолях был повышен по сравнению с гомологичной тканью животных в середине срока беременности, если результаты рассчитывали на единицу массы сырой ткани, РНК или белка. Рассчитанные на единицу массы ДНК результаты не отличались от нормы. Содержание цГМФ из расчета на единицу массы РНК или сырой ткани не отличалось от такового в тканях животных на середине срока беременности, тогда как рассчитанное на единицу массы ДНК или белка оно было существенно ниже.

При попытке расчета уровня циклических нуклеотидов на основании данных о содержании белка, ДНК, РНК, а также о массе сухой или сырой ткани, могут возникнуть недоразумения. Например, если нормальные клетки диплоидны, а опухоли полиплоидны, сравнение уровней циклических нуклеотидов на основе данных о содержании ДНК неправомочно. Неправомочно оно и в том случае, если распределение клеток по стадиям клеточного цикла в нормальной и опухолевой тканях различно. Сравнение уровня циклических нуклеотидов в опухолевых тканях in vivo содержит много неясного. Опухолевая ткань может быть частично некротизирована. Участки жизнеспособной опухолевой ткани могут содержать значительное число инфильтрирующих клеток. Организация системы кровоснабжения опухоли отличается от таковой в нормальной ткани. В отсутствие каких-либо изменений размеров клеток между опухолью и нормальной тканью наиболее целесообразным представляется сравнение содержания циклических нуклеотидов на единицу массы белка.

7.3.2. Гепатома

Повышенное содержание цАМФ обнаружено также в малигнизированных узелках печени крыс (Chayoth et al., 1970) и гепатоме Морриса с различной скоростью роста (Thomas et al., 1973).

7.3.3. Адренокортикальная карцинома

Высокий уровень цАМФ обнаружен в адренокортикальной карциноме человека in vivo (Ney et al., 1969).

7.4. ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ И ЭКСПРЕССИЯ НОРМАЛЬНОГО ФЕНОТИПА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Если низкий уровень цАМФ ассоциирован с малигнизацией и (или) трансформацией, то должна быть возможной реверсия трансформированного фенотипа к нормальному путем повышения внутриклеточного уровня цАМФ. Однако следует помнить, что опухолевые клетки, обычно используемые в эксперименте, гораздо «сложнее» первично трансформированных вследствие появления нескольких дополнительных мутаций в системе цАМФ или в других локусах. Поэтому в данной опухолевой ткани только определенная часть клеток полностью или частично способна к реакции на повышение уровня цАМФ. Ниже обсуждаются типы опухолевых клеток, способных экспрессировать нормальный фенотип после повышения уровня цАМФ.

7.4.1. Нейробластома

Повышение внутриклеточного уровня цАМФ в некоторых клонах культивируемых клеток мышиной и человеческой нейробластом сразу же индуцирует экспрессию морфологических и биохимичес-

ких признаков дифференцировки, характерных для зрелых нейронов (Prasad, 1975; 1979; Prasad, Sinha, 1978). В числе этих признаков — формирование длинных нейритов, дающих потенциалы действия; увеличение размеров сомы и ядра; повышение уровней общего содержания РНК и белка, а также цАМФ-связывающих белков и поли(А)-содержащей мРНК; остановка клеток в G_1-фазе клеточного цикла, повышение активности ферментов тирозингидроксилазы, допамин-β-гидроксилазы, холин-ацетилтрансферазы, ацетилхолинэстеразы, глютамат-декарбоксилазы, цАМФ-фосфодиэстеразы и цАМФ-зависимого фосфорилирования белков; снижение синтеза гистонов и фосфорилирования гистона H_1; повышение чувствительности аденилатциклазы к допамину и норэпинефрину; устранение злокачественности. В регуляции дифференцировки клеток нейробластомы цГМФ, по-видимому, не играет существенной роли. Однако имеется сообщение (Zwiller et al., 1977) о том, что клетки нейробластомы в культуре намного лучше дифференцируются при суммарном воздействии аналогов цАМФ и цГМФ, нежели при действии одним аналогом цАМФ. Это указывает на то, что аналог цГМФ усиливает морфологическую реакцию, индуцированную цАМФ. Полученные in vitro результаты о роли цАМФ в дифференцировке клеток нейробластомы были подтверждены in vivo. Обработка цАМФ-индуцирующими агентами вызывала дифференцировку в нейробластомах мыши (Chang, Prasad, 1976) и человека (Helson, 1975). Кроме того, спонтанная ганглионеврома и симпатические ганглии содержали в 8 раз больше цАМФ, чем незрелая круглоклеточная нейробластома (Imashuku et al., 1977). Присутствие цАМФ-резистентных клеток в опухоли указывает на то, что либо в этих клетках имеются дефекты цАМФ-системы, либо злокачественность определяется другими механизмами, отличными от системы циклических нуклеотидов. Изучение таких клеточных вариантов должно способствовать пониманию механизмов действия цАМФ.

7.4.2. Глиома

Морфологическую дифференцировку как в первичных культурах, так и в клональных клеточных линиях глии крысы (Edström et al., 1973; Perkins et al., 1975; Zim et al., 1973; Klier et al., 1975; Melutyre et al., 1972; Moonen et al., 1975; 1976; Shubert, 1975; Shopiro, 1973) вызывают цАМФ-индуцирующие агенты. Лишение сыворотки и добавление дибутирил-цАМФ вызывают морфологические изменения в культуре астробластов новорожденных крысят, однако лишь в культурах, обработанных дибутирил-цАМФ, наблюдается ультраструктурное усложнение, свидетельствующее об истинной дифференцировке (Lim et al., 1973). Глиальный фактор созревания вызывает 8—12-кратное повышение концентрации цГМФ в культурах глиобластов мозга 17-дневных крысиных эмбрионов. Это повышение сохраняется и после того, как митотическое деление прекращается и клетки вступают в биохимическую дифференцировку (Turriff and Lim, 1979). Уровень цАМФ в культурах глиобластов после сти-

муляции глиальным фактором созревания (GMF) несколько снижался и не возрастал даже после обработки данным фактором в течение 4 сут — времени, соответствующего началу биохимического созревания (Turriff, Lim, 1979). В отличие от клеток нейробластомы действие цАМФ-стимулирующих агентов на морфологическую дифференцировку обратимо вскоре после удаления препарата.

7.4.3. Саркома

Аномальная морфология, высокая скорость роста, снижение адгезивности и повышение агглютинабельности этих трансформированных клеток могут быть устранены путем обработки клеток дибутирил-цАМФ или индукторами цАМФ (Pastan, Johnson, 1974; Ryan, Heidrick, 1974; Pastan et al., 1975; Chalapowski et al., 1975; Willinghan et al., 1972; Rozengurt, Jimenez, 1973). Полученные изменения исчезают вскоре после удаления препаратов.

7.4.4. Клетки яичника китайского хомячка

Обработка клеток яичника китайского хомячка цАМФ-стимулирующими агентами ведет к преобразованию фенотипа этих клеток от злокачественного до близкого к норме (Hsie, Puck, 1971; Puck, 1977). Этот эффект был отнесен к «обратной трансформации». Подобные изменения исчезают вскоре после удаления цАМФ-стимулирующих препаратов.

7.4.5. Мышечные клетки

Внутриклеточный уровень цАМФ, исходный уровень аденилатциклазы и протеинкиназная активность возрастают в процессе дифференцировки культивируемых миобластов цыпленка (Zalin, Montagne, 1974). Уровень цАМФ возрастает, а уровень цГМФ снижается в процессе дифференцировки клеток скелетных мышц куриного эмбриона (Moriyama et al., 1976).

7.4.6. Меланома и овсяноклеточная карцинома

Обработка мышиной меланомы (NCTC 3960, Cloredman — 91, B—16) цАМФ-стимулирующими агентами приводит к необратимым изменениям морфологии и содержания пигментов (Johnson, Pastan, 1972; Kreider et al., 1973). Подобные же изменения были отмечены в культуре клеток меланомы человека после обработки цАМФ-стимулирующими агентами (Helson et al., 1974). Однако существуют варианты клеток, для которых цАМФ служит стимулятором роста опухолевых клеток в культуре (Pawelek et al., 1975).

Обработка культуры клеток овсяноклеточной карциномы дибутирил-цАМФ вызывает морфологические и биохимические изменения (появление катехоламинов), сходные с таковыми в культивируемых клетках нейробластомы (Tsuji et al., 1976).

7.4.7. Другие типы клеток

В процессе дифференцировки яйцевода цыпленка, индуцированной эстрогенами, уровень цАМФ несколько снижался, тогда как уровень цГМФ существенно возрастал (Schumacher et al., 1977). Повышенный уровень цГМФ был также обнаружен в процессе эритропоэза в некоторых системах (Rodgers et al., 1976). Дибутирил-цАМФ индуцировал дифференцировку эпителиальных клеток морской свинки в культуре (Delescluse et al., 1976). Агенты, стимулирующие цАМФ вызывали дифференцировку культивируемых клеток радужной оболочки взрослого тритона (Ortiz, Gamada, 1975). Адренокортикотропный гормон (АКТГ) и цАМФ индуцировали структурную дифференцировку культивируемых клеток коры надпочечников взрослого человека (Armato et al., 1975).

7.5. ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ И РОСТ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Дифференцирующее действие цАМФ на вышеописанные типы клеток обычно связано с торможением клеточного деления. Агенты, стимулирующие цАМФ, подавляют рост некоторых других трансформированных клеток, не вызывая при этом дифференцировки. Однако этот эффект не является специфическим для трансформированных клеток. Стимуляторы цАМФ подавляют рост нормальных клеточных культур и не влияют на рост некоторых трансформированных культур. Ниже описывается действие цАМФ на рост трансформированных и нетрансформированных клеток.

7.5.1. Опухоли молочных желез

Дибутирил-цАМФ и теофиллин обратимо ингибируют агрегацию культивируемых клеток опухолей молочной железы человека (линия BT-20) (Tchao, Leighton, 1976). Дибутирил-цАМФ ингибирует рост двух гормонозависимых опухолей молочных желез крыс (Cho-Chung, Gullino, 1974a) и крысиной карциномы—256 Уокера in vivo (Cho-Chung, Gullino, 1974). Кроме того, он останавливает усиление роста опухоли, вызванное антисывороткой к Nippostronglylus brasiliensis (Keller, 1972).

7.5.2. Гепатома

Дибутирил-цАМФ и цАМФ ингибируют размножение некоторых клонов культуры клеток гепатомы (Wirk et al., 1972; Granner et al., 1975), однако эти агенты стимулируют пролиферативную активность первичной культуры гепатоцитов (Armato et al., 1977). Имеется сообщение (Sharma et al., 1975), что цАМФ может быть ассоциирован с внутриклеточной мембранной модуляцией экспрессии генетической информации в нормальных и неопластических гепатоцитах.

7.5.3. Эпителиальные опухоли

Дибутирил-цАМФ не влияет на рост клеток эпителия простаты человека в культуре, однако цАМФ ингибирует их рост (Niles et al., 1976). Этот эффект не может быть отнесен за счет цАМФ, поскольку цАМФ в сыворотке деградирует до 5′-АМФ, который, как известно, ингибирует рост культивируемых клеток млекопитающих без всякого различия трансформированных и нетрансформированных клеток. Однако 8-бром-цАМФ подавляет рост культуры клеток карциномы простаты человека (Niles et al., 1976). Добавление ингибитора циклонуклеотидфосфодиэстеразы 1-метил-3-изобутилксантина подавляет рост синергично с аналогами цАМФ. Дибутирил-цАМФ и теофиллин in vivo ингибируют рост клеток кожи хомяка, трансформированных вирусом CELO (Reddi, Constantinides, 1972). Теофиллин и цАМФ при внутрибрюшинном введении вызывают 50 %-ное подавление роста асцитных клеток Эрлиха, трансплантируемых мышам подкожно или внутрибрюшинно (Seller, Benson, 1973).

7.5.4. Другие опухоли

Введение цАМФ в опухоль вызывает 50 %-ное угнетение роста лимфомы NKLy у белых мышей (Gerieke, Chandra, 1969). Стимуляторы цАМФ подавляют рост клеток плазмоцитомы (Naseem, Hollander, 1973), мышиной мастоцитомы (Keller, Keist, 1973), рабдомиосаркомы человека (Sandor, 1973), асцита Эрлиха (Kaminskas et al., 1976) и лейкозных клеток (Yang, Vas, 1971) в культуре.

7.5.5. Нормальные фибробласты

Циклический аденозинмонофосфат также обратимо ингибирует рост диплоидных фибробластов человека (Froehlich, Rachmeler, 1972) и нетрансформированных фибробластов мыши (Taylor-Papadimitrious et al., 1975).

7.6. АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Внутриклеточный уровень циклических нуклеотидов регулируется активностью циклаз, фосфодиэстераз, а также уровнем циклонуклеотид-связывающих белков. Некоторые типы трансформированных клеток характеризуются низким уровнем цАМФ по сравнению с нормальными клетками. Поэтому представляется важным знать, в каких случаях низкий уровень цАМФ в трансформированных клетках вызван нарушением активности аденилатциклазы. Для исследования этой проблемы использовано два подхода. Первый заключается в исследовании изменений аденилатциклазной активности в клетках, трансформированных вирусами или химическими канцерогенами, по сравнению с нормальным контролем. Второй — в исследовании изменений аденилатциклазной активности в процессе

цАМФ-индуцированной дифференцировки клеток в культуре; этот подход предполагает возможность противоположных изменений при злокачественной трансформации.

7.6.1. Куриные эмбриональные фибробласты

Трансформация куриных эмбриональных фибробластов вирусом С саркомы Рауса штаммов Bryan (RSV-BH) и Schmidt-Ruppin (RSV-SR) приводит к снижению аденилатциклазной активности (Anderson et al., 1973b). Аналогичные наблюдения отмечались в куриных эмбриональных фибробластах, трансформированных вирусом саркомы птиц (ASV) B77, а также RSV, в частности штаммами Prague и Schmidt-Ruppin (Yoshida et al., 1975). Однако механизм снижения циклазной активности различается в зависимости от типа вируса, использованного для трансформации. В клетках, трансформированных RSV-BH, изменены значения K_M (АТФ) и концентрационная зависимость аденилатциклазы от Mg^{2+}, тогда как в клетках, трансформированных RSV-SR, снижена максимальная скорость ферментативной реакции, но отсутствуют изменения K_M (АТФ) (Anderson et al., 1973 a, b). Циклазная система трансформированных клеток сохраняет способность активироваться простагландином E_1 (Anderson, Jaworsky, 1977).

В куриных эмбриональных фибробластах, трансформированных ts-мутантами RSV, —RSV-BH-Ta и RSV-SR-T5,—нарушение аденилатциклазной активности относится к числу наиболее ранних событий, регистрируемых после их переноса из условий непермиссивной температуры в пермиссивную (Anderson et al., 1973 a, b). Быстрое снижение циклазной активности в RSV-BH-Ta-инфицированных фибробластах вслед за переносом культуры в условия пермиссивной температуры не блокируется ингибиторами синтеза РНК и белка. Это было интерпретировано таким образом, что быстрое изменение аденилатциклазной активности является атрибутивным свойством продукта ts-гена — фактора трансформации (Anderson, Pastan, 1975)[1]. В другой работе (Gidwitz et al., 1976) аденилатциклазная активность мембран фибробластов, трансформированных RSV, оказалась в 2—4 раза ниже, чем в мембранах нормальных фибробластов. Однако специфическая активность солюбилизированного фермента из нормальных и трансформированных клеток была по существу одинакова. Эти данные позволяют полагать, что за снижение аденилатциклазной активности полностью или частично ответственно микроокружение фермента в мембране трансформированной клетки.

---

[1] Такое заключение представляется крайне странным. Действительно, если снижение циклазной активности не отменяется ингибиторами синтеза РНК и белка, то оно в принципе не может быть функцией какого-либо белкового продукта (примеч. переводчика).

7.6.2. Клетки почки крысы

Аденилатциклазная активность существенно снижалась при трансформации нормальных клеток почек крысы (NRK) вирусами саркомы Кирстена или Молони (KiSV, MSV). Фермент из трансформированных клеток не обнаруживает изменений аффинитета к АТФ, однако Mg^{2+}-зависимая активация его нарушена (Anderson et al., 1974). Фермент из трансформированных клеток не чувствителен к PGE_1 как в присутствии, так и в отсутствие ГТФ (Anderson et al., 1974), а также к L-эпинефрину (Anderson, Taworsky, 1977).

7.6.3. Мышиные эмбриональные фибробласты

Стабилизированная линия трансформированных клеток, производных от 3Т3, характеризуется сниженным уровнем цАМФ по сравнению с родительской линией (Pastan, Johnson, 1974; Ryan, Heidrick, 1974; Pastan et al., 1975; Chalapowcki et al., 1975). Однако спонтанно трансформированные мышиные эмбриональные фибробласты 3Т6 (Makman, 1974; Sheppard, Bannai, 1974), а также клетки 3Т3, трансформированные полиомавирусом (Makman, 1974), MSV-MULV (Perry et al., 1971) и SUT-2 (Perry et al., 1971), имели повышенный исходный уровень аденилатциклазы. Активность фермента в контрольных клетках BALB/3T3 увеличена в присутствии ГТФ, PGE_1 или L-эпинефрина, но в клетках BALB/3T3, трансформированных РНК-содержащими вирусами (Кирстена, Молони, Харви), ДНК-содержащими вирусами (OB40), 3-метилхолантреном или спонтанно (S 2c13), уровни исходной ГТФ-стимулированной и флюоритстимулированной циклазной активности выше, чем в нормальной линии 3Т3 (Anderson, Jaworski, 1977). Однако фермент из трансформированных клеток обладает пониженной чувствительностью к эпинефрину и простагландинам.

Недостаток гормоночувствительности аденилатциклазы наблюдается также в нормальных клетках почки крысы (NRK) и BALB/3T3 вскоре после заражения большими дозами вирусов (Anderson, Jaworski, 1977). Следует отметить, что стабилизированные клеточные линии утрачивают гормоночувствительность при продолжительном культивировании (De Rubertis et al., 1976).

Остается невыясненным, являются ли изменения аденилатциклазы, наблюдаемые в трансформированных клетках, следствием или причиной трансформации.

Снижение уровня аденилатциклазной и повышение уровня гуанилатциклазной активности по сравнению с нормальной тканью простаты наблюдались в фибросаркоме простаты крысы, индуцированной 20-метилхолантреном (Shima et al., 1976).

Интересно, что гуанилатциклазная активность значительно снижена или вовсе не определяется в тех трансформированных клетках NRK и BALB/3T3, которые обладают низкой или несущественной способностью к гормоностимуляции аденилатциклазы (Anderson, Jaworski, 1977).

7.6.4. Карцинома

Изучение аденилатциклазы в медуллярных карциномах (De Rubertis et al., 1972) и в бифункциональных аденомах щитовидной железы человека (Larsen et al., 1973) не установило существенных различий аденилатциклазной активности и ее стимуляции тиреотропными гормонами в зависимости от степени малигнизации. Аналогичное исследование опухолей щитовидной железы человека было проведено Sand и соавт. (1976). Однако цАМФ-зависимая протеинкиназная активность в карциноме была в 4 раза выше, чем в нормальной ткани. Аденилатциклазная активность в опухолях молочных желез мышей в 3—4 раза выше, чем в нормальной ткани (Sheth et al., 1974). В опухолях молочных желез крыс, индуцированных 9,10-диметил-1,2-бензантраценом, уровень аденилатциклазы был бы также повышен по сравнению с нормальной тканью девственных или беременных животных, тогда как гуанилатциклазная активность была одинаковой (Rillema et al., 1978). В неопластической ткани молочной железы человека аденилатциклазная активность в расчете на единицу массы ткани или клеточного белка была существенно повышена. Однако в расчете на клетку неопластическая ткань характеризовалась сниженной ферментативной активностью (Kung et al., 1977).

7.7. АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА В ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

7.7.1. Нейробластома

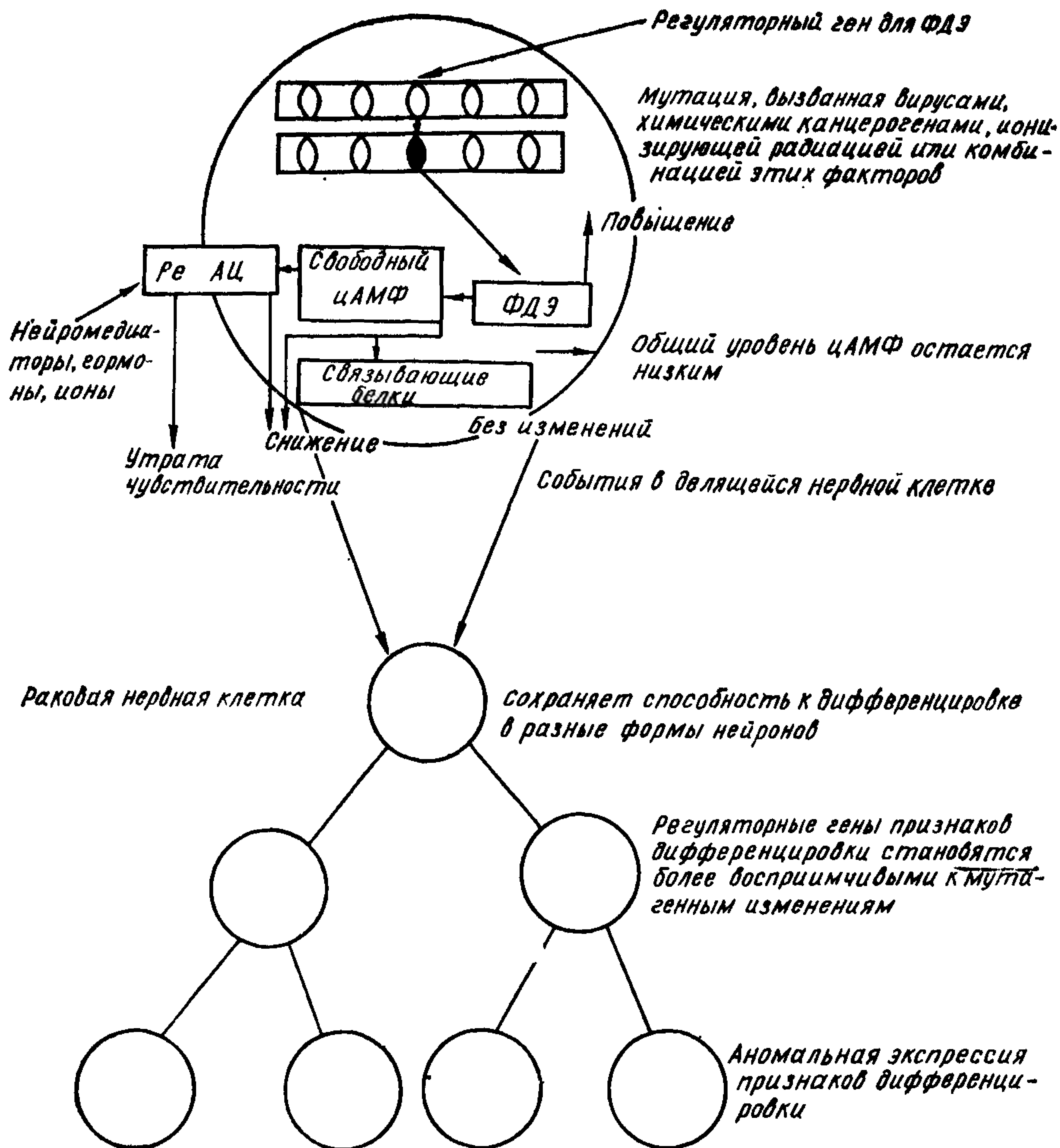
Повышение внутриклеточного уровня цАМФ в культивируемых клетках нейробластомы приводит к экспрессии признаков дифференцировки, характерных для зрелых нейронов, и к снижению злокачественности (Prasad, 1975, 1979; Prasad, Sinha, 1978). Это создает удобную модель для изучения изменений в системе цАМФ при дифференцировке и малигнизации. В дифференцированных под действием цАМФ клетках нейробластомы наблюдались следующие изменения аденилатциклазы: исходная активность аденилатциклазы возрастала в некоторых клонах дифференцированных клеток, тогда как в других оставалась неизменной; ответ допамин- и норэпинефринчувствительной аденилатциклазы возрастал, тогда как PGE_1-чувствительной — не изменялся; ГТФ не увеличивала PGE_1-стимулированную активность в малигнизированных клетках, но существенно повышала ее в дифференцированных по сравнению с малигнизированными (Prasad et al., 1975a). Наблюдались некоторые количественные различия действия двухвалентных катионов. Например, Ca^{2+} большой концентрации (10 мМ) ингибировал аденилатциклазную активность в гомогенатах дифференцированных клеток примерно на 20 %, но не влиял на активность фермента в малигнизированных клетках. Экзогенный Mg^{2+} такой же концентрации ингибировал аденилатциклазную активность дифференцированных и малигнизированных

клеток на 46 и 20 % соответственно (Prasad et al., 1975a). Таким образом, чувствительность аденилатциклазы к нейромедиаторам и двухвалентным ионам, а также чувствительность PGE_1-стимулированной аденилатциклазной активности к ГТФ возрастают в клетках нейробластомы, дифференцированных под действием цАМФ. Поэтому мы полагаем, что реверсия малигнизации может быть истинной. Однако вновь остается неясным, являются ли наблюдаемые изменения причиной или следствием малигнизации (Prasad, Gilmer, 1974; Prasad et al., 1975a).

7.8. ЦИКЛОНУКЛЕОТИДФОСФОДИЭСТЕРАЗА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

7.8.1. Нейробластома

Из опубликованных данных можно заключить, что повышени цАМФ-фосфодиэстеразной активности для некоторых типов клеток относится к числу ранних нарушений при малигнизации. Основываясь на данных, полученных при изучении клеток мышиной нейробластомы, можно представить основные события, происходящие при малигнизации нервной клетки, в виде диаграммы (рисунок). Обратные изменения могут происходить, если клетки идут по пути нормальной дифференцировки. Ниже описана модель, выдвинутая Prasad (1974). Эта модель предполагает, что мутация регуляторного гена цАМФ-фосфодиэстеразы в одной и (или) в группе делящихся нервных клеток может быть вызвана вирусами, химическими канцерогенами, ионизирующей радиацией, а также любой комбинацией этих факторов, и это мутационное изменение может увеличить фосфодиэстеразную активность мутантной клетки. Высокая цАМФ-фосфодиэстеразная активность может привести к низкому уровню цАМФ и может предотвратить накопление цАМФ, вызванное стимуляцией аденилатциклазы нейромедиаторами. Эти изменения способны, в свою очередь, предотвратить экспрессию нейрональных дифференцировочных признаков в мутантной нервной клетке, превращая ее тем самым в раковую клетку. Регуляторные гены других признаков дифференцировки в дочерней клетке могут впоследствии стать более чувствительными к мутантным воздействиям, способным вызвать дальнейшие молекулярные повреждения. Клетки нейробластомы, полученные из опухоли, количественно и качественно различаются между собой экспрессией клеточных признаков и чувствительностью к различным препаратам. Мутантные нервные клетки, на первый взгляд, сохраняют способность дифференцироваться в различные формы нервных клеток. Это подтверждается тем фактом, что нейробластома содержит множество типов нервных клеток (Amano et al., 1973; Knapp, Mandell, 1974; Prasad et al., 1973), а именно: адренергические, холинергические, сенсорные и серотониновые клетки. Однако дифференцировочные признаки этих типов клеток выражены неадекватно, и поэтому они продолжают делиться. Некоторые экс-



Схема, поясняющая постулированный механизм развития малигнизации нервных клеток. Обозначения: ФДЭ — фосфодиэстераза; АЦ — аденилатциклаза; Ре — рецептор. Из работы Prasad, 1974.

периментальные данные подтверждают предложенную гипотезу (Prasad, 1975; 1979; Prasad, Sinha, 1978).

Гипотеза о том, что повышение цАМФ-фосфодиэстеразной активности может быть одним из наиболее ранних нарушений при малигнизации нервных клеток (Prasad, 1974), по-видимому, применима и к другим опухолям. Примеры приведены ниже.

7.8.2. Лейкоз и лимфома

Повышенная цАМФ-фосфодиэстеразная активность наблюдалась в тимусе мышей AKR при переходе от предлейкозного состояния к лейкозному (Kemp et al., 1975; Menahan, Kemp, 1976). Этим может

объясняться низкий уровень внутриклеточного цАМФ при высокой аденилатциклазной активности. Показано (Hait, Weiss, 1976), что две перевиваемые линии мышиных лимфоидных опухолей обладают более высоким уровнем цАМФ- и цГМФ-фосфодиэстеразной активности, чем препараты лимфоцитов из нормальных лимфоузлов. Сходные наблюдения были проведены на лимфоцитах больных хронической лимфоидной лейкемией по сравнению с лимфоцитами здоровых доноров (Monohan et al., 1975).

7.8.3. Саркома

Имеется сообщение (Watterson et al., 1976), что концентрация кальцийсвязывающего модулятора цАМФ-фосфодиэстеразной активности увеличивается в куриных эмбриональных фибробластах при трансформации вирусом саркомы Рауса.

7.8.4. Гепатома

В экстрактах гепатомы 3924А цГМФ-фосфодиэстеразная активность с низким значением $К_М$ была сильно уменьшена, при одновременном увеличении цАМФ-фосфодиэстеразы с низким значением $К_М$ по сравнению с экстрактом нормальной печени (Shoji et al., 1977). Высокий уровень цГМФ в гепатоме может быть частично обусловлен сниженной активностью цГМФ-фосфодиэстеразы.

7.8.5. Опухоли молочных желез

Некоторые результаты указывают на то, что различия значений циклонуклеотидфосфодиэстеразной активности нормальных и трансформированных клеток зависят от метода получения результатов. Например, при расчете на содержание РНК или на массу сырой ткани активность циклонуклеотидфосфодиэстеразы в ткани опухолей молочных желез крыс, индуцированных 9,10-диметил-1,2-бензантроценом, обычно, выше, чем в нормальной ткани девственных крыс или в середине срока их беременности (Kung et al., 1977). Однако по отношению к содержанию белка или ДНК циклонуклеотидфосфодиэстеразная активность в опухолях была на уровне или ниже значений указанных контролей. В другом исследовании значения циклонуклеотидфосфодиэстеразной активности клеток молочной железы в культуре были ниже, чем в нормальной ткани (Cohen et al. 1976). Однако в опухоли молочной железы человека они были выше, чем в контроле (Singer et al., 1976), а в неметастазирующей карциноме молочной железы крысы выше, чем в метастазирующей и в ткани метастазов (Chatterjee, Kim, 1975). В опухолевой ткани молочной железы человека циклонуклеотидфосфодиэстеразная активность в расчете на массу ткани или на содержание в ней белка была существенно увеличена (Matusik, Hiff, 1976). Если же эти данные рассчитывали на клетку, то ферментативная активность опухолевой ткани оказывалась сниженной.

7.9. ЦИКЛОНУКЛЕОТИД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ЦИКЛОНУКЛЕОТИД-ЗАВИСИМЫЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Единственный известный механизм действия цАМФ на клетки млекопитающих — это фосфорилирование специфических белков протеинкиназами (Kuo, Greengard, 1969a, b), тогда как у бактерий протеинкиназы не являются основными рецепторами для циклических нуклеотидов (Pastan et al., 1971; Sun et al., 1975). Протеинкиназы, зависимые от цАМФ, состоят из регуляторных субъединиц (P_1 и P_2) и каталитических субъединиц (Corbin et al., 1975; Hofmann et al., 1975; Yamamura et al., 1973; Corbin, Keely, 1977). Связывание регуляторных единиц с каталитическими инактивирует протеинкиназы. Связывание цАМФ с регуляторной субъединицей освобождает каталитическую субъединицу, которая затем фосфорилирует различные белки. В некоторых тканях были обнаружены эквимолярные концентрации каталитических и регуляторных субъединиц цАМФ-зависимых протеинкиназ (Corbin et al., 1977; Hofmann et al., 1977; Lohmann et al., 1978; Majors, 1977), что заставило предположить постоянную координацию уровней каталитических и регуляторных субъединиц. Однако в случае злокачественной клетки или развивающейся системы это может происходить иначе. Новейшие работы показывают, что в некоторых клетках существуют цАМФ-связывающие белки, отличные от таковых в составе регуляторных субъединиц (Heland, Doskeland, 1977; Sugden, Corbin, 1976; Culver et al., 1979; Sy, Richter, 1972; Chambaut et al., 1971; Guh, Tao, 1974; Tsuzuki, Kiger, 1975; Lee, Jungmann, 1975).
Функциональное значение этих белков не выяснено. Кроме того, сами по себе регуляторные субъединицы могут иметь более чем одну функцию, особенно в процессе дифференцировки или злокачественной трансформации.

7.10. РОЛЬ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В ПЕРЕЖИВАНИИ И РОСТЕ

7.10.1. Лимфома

Роль цАМФ-связывающих белков в переживании и росте различается в зависимости от типа клеток. Мутантные клетки мышей лимфомы S 49, совершенно не чувствительные к цАМФ, лишены цАМФ-связывающей активности (Coffino et al., 1975) и цАМФ-зависимой протеинкиназной активности (Daniel et al., 1973). Это дает возможность полагать, что цАМФ-зависимые белки или цАМФ-зависимое фосфорилирование не важны для переживания и роста клеток лимфомы в культуре.

7.10.2. Гепатома

Описанный выше факт подкрепляется также наблюдением, согласно которому дибутирил-цАМФ активирует протеинкиназную активность in vivo, но не ингибирует рост клеток гепатомы в культуре

(Granner et al., 1972). Хотя протеинкиназная активность в цитозоле клеток НТС (гепатомы) втрое выше, чем в печени (Granner, 1972), цАМФ, однако, стимулирует киназную активность в печени впятеро по сравнению с активностью в цитозоле клеток НТС (Granner, 1972). Это позволяет предположить нарушение регуляции протеинкиназ в гепатоме. Быстрорастущая гепатома ассоциирована с низким связыванием цАМФ и высоким связыванием цГМФ (Goldberg et al., 1975).

Имеется сообщение (Sharma et al., 1976), что в клетках нормальной печени крысы существует лишь один сайт связывания цАМФ на мембранах эндоплазматического ретикулума, тогда как связывание цАМФ внутриклеточными мембранами гепатомы 5123С и 7777 осуществляется двумя эффективными сайтами. Для одного из них константа связывания с цАМФ сравнима с таковой в нормальной печени, тогда как второму присуща константа связывания, в 4—40 раз превышающая нормальную. Кроме того, в мембранах эндоплазматического ретикулума гепатомы Морриса обнаруживается сайт связывания для цГМФ, отсутствующий в нормальной печени. Физиологическое значение этих связывающих белков не выяснено.

7.10.3. Саркома

В фибробластах А9Н (нетуморогенных) и гибридных клетках A9H/TLXD (туморогенных) ингибиторное действие цАМФ, по-видимому, связано с его способностью активировать цАМФ-зависимую протеинкиназу (Tisdale, Phillips, 1977). Это сходится с результатами, полученными на клетках мышиной лимфомы (Insel et al., 1975).

7.10.4. Опухоли молочных желез

Отмечена также корреляция нарушенного связывания цАМФ в опухолевом цитозоле и нечувствительности карциномы Уокера 256 к дибутирил-цАМФ, тогда как в линии, чувствительной к дибутирил-цАМФ, нарушение связывания не обнаружено (Cho-Chung, Clair, 1975). Позднее появилось сообщение (Cho-Chung, Clair, 1977), что термостабильные связывающие белки проявляют более высокий аффинитет к цАМФ по сравнению с термолабильными связывающими белками. Чувствительные опухоли содержат более стабильные цАМФ-связывающие белки, чем нечувствительные. Далее, в процессе обработки дибутирил-цАМФ в ядрах накапливаются только термостабильные связывающие белки, обладающие высоким аффинитетом к цАМФ. Эти результаты показывают, что нечувствительность к обработке дибутирил-цАМФ тесно связана с качественными дефектами цАМФ-связывающих белков (Cho-Chung, Clair 1977). При регрессии ДМБА-индуцированных опухолей молочных желез крыс после овариоэктомии возрастание уровня цАМФ-связывающих белков ассоциировано с возрастанием гистонкиназной активности (Cho-Chung et al., 1978). Это заставляет предположить, что цАМФ может участвовать в регуляции роста гормонозависимых

опухолей молочных желез крыс. Другое исследование показало (Eppenberger et al., 1977), что клеточные уровни цАМФ-зависимой протеинкиназы и цАМФ-связывающей активности белков в неопластической ткани молочных желез человека снижаются.

7.10.5. Опухоли коры надпочечников

Недостаток активности цАМФ-зависимой протеинкиназы был обнаружен в цитозольной фракции цАМФ-резистентной мутантной линии клеток опухоли коры надпочечника мыши (Futman et al., 1978). Нарушение ферментативной активности характеризовалось семикратным снижением и измененной эффективностью связывания с цАМФ мутантного фермента по сравнению с ферментом исходной линии. Протеинкиназный мутант дает скудный стероидогенный ответ на АКТГ и цАМФ. Блокады роста и морфологических изменений, вызываемых этими агентами, в исходной линии клеток не происходит. Эти результаты наводят на мысль, что цАМФ-зависимая протеинкиназа важна для регуляции стероидогенеза в надпочечниках, морфологии и роста под влиянием адренокортикотропного гормона (Gutman et al., 1978).

7.10.6. Другие опухоли

Некоторые исследователи полагают (Tisdale, Phillips, 1977; Prasad et al., 1975, 1976), что уровень растворимых цАМФ-связывающих белков ассоциирован скорее с состоянием дифференцировки и внутриклеточным уровнем цАМФ. Имеются сообщения о недостаточности цАМФ-связывающих белков в некоторых злокачественных клетках в культуре (Granner, 1972; Criss, Morris, 1973; Goldberg et al., 1975).

7.11. ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В МАЛИГНИЗАЦИИ

Повышение уровня цАМФ-связывающих белков в дифференцированных клетках нейробластомы связано с необратимым эффектом цАМФ, но не это является причиной необратимости, так как повышение связывания наблюдается в делящихся нейробластомных клетках через 24 ч после обработки PGE_1 (Prasad et al., 1976) или через 19 ч после обработки дибутирил-цАМФ (Prasad, Rosenberg, 1978). Таким образом, повышение уровня связывающих белков может быть одним из важных событий, существенных для поддержания необратимой нервной дифференцировки (Prasad et al., 1976). В клетках глиомы (Prasad et al., 1976; Walter et al., 1979) и L-клетках (Prasad et al., 1975) после обработки цАМФ-стимулирующими препаратами не наблюдалось повышение уровня цАМФ-связывающих белков. С этим, в частности, связана обратимость действия цАМФ в опухолевых клетках не нейрального происхождения вскоре после удале-

ния препарата. Итак, либо в культивируемых клетках крысиной глиомы существует деффект регуляции цАМФ-связывающих белков, либо уровень цАМФ-связывающих белков в клетках глиомы не регулируется цАМФ (Prasad et al., 1976). Однако в других, не нейральных, опухолях, таких, как некоторые опухоли молочных желез, регрессия опухоли после овариоэктомии и лечения дибутирил-цАМФ была ассоциирована с повышением уровня цАМФ-связывающих белков (Cho-Chung, Clair, 1977). Это — первое подтверждение in vivo результатов, полученных на культивируемых клетках нейробластомы (Prasad et al., 1975; Prasad et al., 1978; Walter et al., 1979), о значении цАМФ-связывающих белков для малигнизации.

В развивающейся печени крысы цитозольная фракция и осадок (100 000 g) имели наибольшую цАМФ-связывающую активность за 3—4 сут до рождения, затем отмечалось ее снижение к моменту рождения и в течение постнатального периода (Lee, Tungmann, 1975). Корреляция изменений цАМФ-связывающей активности и цАМФ-зависимости протеинкиназной активности субклеточных фракций в развивающейся печени отсутствовала. Это дает возможность полагать (Lee, Jungmann, 1975), что измеренная цАМФ-связывающая активность не отражает нарушений регуляторной цАМФ-зависящей субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы в процессе развития. Возможно, что некоторые из цАМФ-связывающих белков не являются регуляторными субъединицами цАМФ-зависимой протеинкиназы. Интересно, что внутриклеточный уровень цАМФ (Novak et al., 1972), так же как цАМФ-связывающий белок в цитозоле и осадочных фракциях, повышается в печени 5—10-дневных крысят. Поэтому можно сделать вывод, что цАМФ-связывающий белок в это время облегчает сохранность и компартментализацию циклического нуклеотида (Lee, Jungmann, 1975).

7.12. РЕГУЛЯЦИЯ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Возрастание внутриклеточного уровня цАМФ увеличивает уровень цАМФ-связывающих белков в культивируемых клетках мышиной нейробластомы (Prasad et al., 1975b, 1976). Аналогичные исследования проведены и на ином клоне клеток нейробластомы (Prasad, Rosenberg, 1978), клетках нейробластомы человека (Imashuku et al., 1979) а также на мозге крысы в процессе их дифференцировки (Culver et al., 1979). Другие факторы, такие, как рентгеновское облучение и бессывороточная среда (Prasad, 1970; Seeds et al., 1970), индуцирующие один или более признаков дифференцировки (Prasad, 1975), не повышают уровень цАМФ-связывающих белков (Prasad et al., 1976). Дальнейшие исследования показали, что цАМФ повышает уровень R_1-рецепторных белков, например, в культивируемых гибридных клетках нейробластомы (Walter et al., 1979).

Циклические ГМФ и АМФ связываются с одними и теми же белками, однако цГМФ обладает в 10 раз меньшей аффинностью, чем цАМФ (Prasad et al., 1975b). Этим, возможно, объясняется, в частности, крайне низкий внутриклеточный уровень цГМФ (1/100

уровня цАМФ) в клетках нейробластомы (Prasad, 1975). Далее было показано (Ehrlich et al., 1978), что цГМФ и цАМФ одинаково стимулируют протеинкиназную активность, однако необходимая для этого концентрация цГМФ в 10 раз превышала таковую цАМФ. Это позволяет предполагать, что в клетках нейробластомы нет специфических цГМФ-рецепторных белков или протеинкиназ. Однако возможно, что специфические цГМФ-зависимые протеинкиназы или рецепторные белки не могли быть обнаружены при измерении общей связывающей или фосфорилирующей активности.

7.13. ЗНАЧЕНИЕ цАМФ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Мы предполагали (Prasad et al., 1975b, 1976), что повышение уровня цАМФ-связывающих белков может являться одним из важных внутриклеточных механизмов сохранения высокого уровня цАМФ во время дифференцировки клеток нейробластомы. Результаты исследований показали, что уровни цАМФ и цАМФ-фосфодиэстеразной активности повышаются в дифференцированных клетках нейробластомы (Prasad, 1975) так же, как в зрелом мозге (Butcher, Sutherland, 1962; Ebadi et al., 1971; Sutherland et al., 1962). Повышенное количество связывающих белков в дифференцированных клетках может служить объяснением увеличения уровня внутриклеточного цАМФ, поскольку цАМФ, связанный с белком, относительно менее чувствителен к ферментативному гидролизу (Prasad et al., 1976). Действительно, уровень цАМФ-связывающих белков, в частности белка с молекулярной массой 127 000 и цАМФ-рецепторного белка R_I, повышается в процессе развития мозга крысы, тогда как рецепторный белок R_{II} снижается с возрастом (Culver et al., 1979).

Одна из работ (Chayoth et al., 1970) иллюстрирует, что количество регуляторных субъединиц протеинкиназ R_I и R_{II} или каталитических субъединиц не изменяется существенно в процессе развития мозга крысы (2- и 40-дневные крысы). Другая — подчеркивает, что обнаружена корреляция протеинкиназной активации и подавления роста трансплантируемой лимфомы TLX5 и гибрида A95 (фибробласты) × TLXD (лимфома), не индуцирующего опухоль (Tisdale, Phillips, 1977). Культивируемые нормальные и вирус-трансформированные фибробласты мыши имеют эквивалентное общее количество цАМФ-рецепторов с близкими значениями аффинитета к цАМФ и сходное распределение изозимов цАМФ-зависимой протеинкиназы. В фибросаркоме простаты крыс, индуцированной 20-метилхолантреном, связывание цАМФ и цАМФ-стимуляция протеинкиназ близки к таковым в нормальной ткани простаты Shima et al., 1976). Эти данные не подтверждают мнения, что нарушенное связывание цАМФ существенно для неуправляемого роста всех типов клеток in vivo.

7.14. ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

Уровень фосфопротеинфосфатазы, фермента деградации протеинкиназ, был более высоким в гепатоме, чем в печени, при расчете на количество растворимого белка (Shoji et al., 1977). Однако при расчете на массу ткани различия отсутствовали. Это связано с тем, что в гепатоме растворимые белки составляют лишь 6 % массы свежей ткани, тогда как в печени — 12 %. Значение более высокой специфической активности фосфатазы в цитозоле гепатомы не выяснено. Возможно, она смягчает действие цАМФ-зависимых протеинкиназ.

7.15. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Есть некоторые сомнения в том, что дефект цАМФ-системы — одно из биохимических нарушений, связанное с трансформацией, по крайней мере, некоторых типов клеток млекопитающих. Только те исследования, в которых эффект цАМФ вызывается одним аналогом цАМФ, одним стимулятором аденилатциклазы и одним ингибитором циклонуклеотидфосфодиэстеразы, могут рассматриваться как относящиеся к делу. К сожалению, многие из опубликованных работ содержат информацию только о действии одного аналога цАМФ (широко используемого дибутирил-цАМФ) на трансформированные клетки в культуре.

Участие циклических нуклеотидов в процессах роста, дифференцировки и малигнизации не может быть определено в таких исследованиях. При отсутствии каких-либо изменений размера клеток расчет уровня цАМФ на единицу массы белка представляется наиболее целесообразным. Данные, основанные на содержании ДНК, могут быть достоверными только в том случае, если распределение клеток по стадиям клеточного цикла в нормальных и трансформированных тканях или культурах сходно, а также если число хромосом диплоидно как в нормальных, так и в трансформированных клетках. Этот вопрос становится принципиально важным при анализе уровня циклических нуклеотидов в опухолевой ткани in vivo, где распределение клеток по стадиям клеточного цикла значительно изменяется в зависимости от участка опухоли. В фибробластах, вероятно, существуют изменения аденилатциклазы, связанные с трансформацией, тогда как в других трансформированных клетках (нейробластоме, лейкозе, лимфоме) повышение цАМФ-фосфодиэстеразной активности может быть одним из ранних проявлений малигнизации нервных клеток. Это позволяет сделать вывод, что в некоторых типах клеток регуляторный ген цАМФ-фосфодиэстеразы может быть более чувствительным к мутационным изменениям, ведущим к трансформации и далее к малигнизации.

Не имеется надежных данных о роли цАМФ-зависимого фосфорилирования специфических белков в росте, дифференцировке и малигнизации. В некоторых исследованиях в качестве субстратов протеинкиназной активности были использованы экзогенные гистоны. Эти исследования не могут рассматриваться как адекватные,

поскольку фосфорилирование экзогенных гистонов не отражает фосфорилирования эндогенных белков. Так как реакции клеточного фосфорилирования (цАМФ-зависимого и цАМФ-независимого) крайне чувствительны к экзогенным факторам, они могут отражать неспецифические изменения, связанные с ростом или переживанием. Например, мутантная лимфома мышей S-49 полностью лишена цАМФ-зависимых протеинкиназ. Мы наблюдали (Ramanujam, Prasad, 1979), что обширные нарушения реакций фосфорилирования цАМФ-зависимых и цАМФ-независимых специфических белков происходят после хронической обработки (4—5 недель) нейробластомы или глиомы низкой концентрацией метилмеркурийхлорида (CH_3HgCl). При этом морфология и время удвоения обработанных и необработанных CH_3HgCl клеток были сходны.

По-видимому, уровень цАМФ-связывающих белков может иметь значение для дифференцировки и малигнизации. Есть сообщения о существовании свободных цАМФ-связывающих белков, отличных от регуляторных субъединиц цАМФ-зависимых протеинкиназ. Результаты показывают, что значение цАМФ-связывающих белков зависит от организации, типа клеток, а также от стадии онтогенеза. Было установлено, что уровни цАМФ-связывающих белков могут обеспечивать один из внутриклеточных механизмов сохранения высокого уровня цАМФ в процессе дифференцировки клеток нейробластомы. В других опухолях обнаружены дефекты цАМФ-связывающих белков.

Несмотря на широкое исследование роли циклических нуклеотидов в трансформации, росте и дифференцировке клеток млекопитающих, остаются пока без ответа следующие вопросы. Почему цАМФ индуцирует нормальный фенотип у одних типов трансформированных клеток и не индуцирует у других? Играет ли цГМФ какую-либо роль в инициации, поддержании трансформированного состояния или в модулирующем эффекте цАМФ? Каковы ранние изменения транспорта макромолекул (аминокислот, глюкозы, ионов, микроэлементов, нуклеозидов и т. д.)., следующие за повышением уровней внутриклеточных цАМФ и (или) цГМФ? Какова роль цАМФ-связывающих белков, отличных от R_I и R_{II} рецепторных белков, в дифференцировке и трансформации? Какова роль цАМФ-зависимого фосфорилирования специфических белков в инициации, поддержании или реверсии трансформированного состояния? Для ответа на некоторые из этих вопросов может быть полезным использование различных цАМФ-чувствительных и цАМФ-резистентных клонов одного и того же типа клеток. Кроме того, для определения роли циклических нуклеотидов в канцерогенезе может оказаться полезным исследование изменений в системе циклических нуклеотидов и эффекта повышения уровней циклических нуклеотидов при химически-, вирус-индуцированной и спонтанной трансформации.

Amano T., Richelson E., Nirneberg M. (1973). Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 258—263.
Anderson W. B., Jaworski C. J. (1977) Adenylate cyclase activity of normal and transformed fibroblasts in culture. Natl. Cancer Inst., Monogr. 48, 365—374.
Anderson W. B., Pastan I. (1975). Altered adenylate cyclase activity : Its role in growth regulation and malignant transformation of fibroblasts. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 681—698.
Anderson W. B., Johnson G. S., Pastan I. (1973a). Transformation of chick embryo fibroblasts by wild-type and temperature-sensitive Rous sarcoma virus alters adenylate cyclase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 1055—1059.
Anderson W. B., Lovelace E., Pastan I. (1973b). Adenylate cyclase activity is decreased in chick embryo fibroblasts fransformed by wild-type and temperature-sensitive Schmidt-Ruppin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1293—1299.
Andreson W. B., Gallo M., Pastan I. (1974). Adenylate cyclase activity in fibroblasts transformed by Kirstein or Moloney sarcoma viruses: Decreased activity and loss of response to prostaglandin E_1. J. Biol. Chem., **249**, 7041—7048.
Armato U., Nussdorfer G. S., Mazzochi G., Andreis P. G., Draghi E. (1975). Cyclic AMP induces ultrastructural differentiation of normal adult human adrenocortical cells cultured in vitro. Am. J. Anat. **142**, 533—538.
Armato U., Draghi E., Andreis P. G. (1977). Effects of purine cyclic nucleotides on the growth of neonatal rat hepatocytes in primary tissue culture. Exp. Cell Res. **105**, 337—347.
Busse E., Rose H., Riessbeck K. H. (1979). Changes in mouse skin cyclic nucleotides during chemical carcinogenesis and tumor response to treatment with BCG, L-dopa and cyclic DBAMP. J. Natl. Res. Clin. Oncol. **94**, 121—130.
Butcher R. W., Sutherland W. W. (1962). Adenosine 3′,5′-phosphate in biological materials. Purification and properties of cyclic nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3′,5′-prosphate in human urine. J. Biol. Chem., **237**, 1244—1245.
Chalapowski F. J., Kelley L. A., Butcher R. W. (1975). Cyclic nucleotides in cultured cells. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. **6**, 245—338.
Chambaut A. M., Leray R. F., Hanoune J. (1971). Relationship between cyclic AMP-dependent protein kinase(s) and cyclic AMP binding protein(s) in rat liver. FEBS Lett. **15**, 328—334.
Chang J. H. T., Prasad K. N. (1976). Differentiation of mouse neuroblastoma cells in vitro and in vivo induced by cyclic adenosine monophosphate (cAMP). J. Pediatr. Surg. **11**, 847—858.
Chatterjee S. K., Kim V. (1975). Adenosine 3′,5′-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in metastasizing and nonmetastasizing rat mammary carcinomas. J. Natl. Cancer Inst. **54**, 181—186.
Chayoth R., Epstein S., Field J. B. (1970). Increased cyclic AMP levels in malignant hepatic nodules of ethione treated rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. **49**, 1663—1670.
Cho-Chung Y. S., Clair T. (1975). The role of cAMP on neoplastic cell growth and regression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 768—772.
Cho-Chung Y. S., Clair T. (1977). Altered cyclic AMP-binding and cyclic AMP-unresponsiveness in vivo. Nature (London) **265**, 452—454.
Cho-Chung Y. S., Gullino P. M. (1974a). In vivo inhibition of growth of two hormone-dependent mammary tumors by dibutyryl cyclic AMP. Science **183**, 87—88.
Cho-Chung Y. S., Gullino P. M. (1974b). Effect of dibutyryl cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate on in vivo growth of Walker 256 carcinoma: Isolation of responsive and unressponsive cell populations. J. Natl. Cancer Inst. 52, 995—996.
Cho-Chung Y. S., Bodwin J. S., Clair T. (1978). Cyclic AMP-binding proteins: Inverse relationship with estrogen-receptors in hormone-dependent mammary tumor regression. Eur. J. Biochem. 86, 51—60.
Coffino P., Bourne H. R., Tomkins G. M. (1975). Somatic genetic analysis of cyclic AMP action : Selection unresponsive mutant. J. Cell. Physiol. 85, 603—610.
Cohen L. A., Chan P. (1975). Intracellular cAMP levels in normal rat mammary gland and adenocarcinoma. In vivo versus in vitro. Life Sci. **16**, 167—175.

Cohen L. A., Straka D., Chan P. (1976). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal and neoplastic rat mammary cells grown in monolayer culture. Cancer Res. **36**, 2007—2012.
Corbin J. D., Keely S. L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. J. Biol. Chem. **252**, 910—918.
Corbin J. D., Keely S. L., Park C. R. (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinase in adipose, cardiac and other tissues. J. Biol. Chem. 250, 218—225.
Corbin J. D., Sugden P. H., Lincoln T. M., Keely S. L. (1977). Compartmentalization of adenosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. J. Biol. Chem. 252, 3854—3861.
Criss W. E., Morris H. P. (1973). Protein kinase activity in Morris hepatomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 380—386.
Culver B., Hoyer P. B., Haley B. E. (1979). Ontogeny of cyclic AMP binding proteins in rat brain. Soc. Neurosci. 6, 157.
Daniel V., Litwack G., Tomkins G. M. (1973). Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate and isolation of resistant variants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 76—79.
Delescluse D., Fukuyama K., Epstein W. L. (1976). Dibutyryl cyclic AMP-induced differentiation of epidermal cells in tissue culture. J. Invest. Dermatol. 68, 8—13.
DeRubertis F. R., Yamashita K., Dekker A., Larsen P. R., Field J. B. (1972). Effects of thyroid-stimulating hormone on adenyl cyclase activity and intermediary metabolism of «cold» thyroid nodules and normal human thyroid tissue. J. Clin. Invest. 51, 1109.
DeRubertis F. R., Chayoth R., Field J. B. (1976). The content and metabolism of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in adenocarcinoma of the human colon. J. Clin. Invest. 57, 641—649.
Ebadi M. S., Weiss B., Costa E. (1971). Distribution of cyclic adenosine monophosphate in rat brain. Arch. Neurol. 24, 353—357.
Edstrom A., Kanje M., Walum E. (1974). Effects of dibutyryl cyclic AMP and prostaglandin E_1 on cultured human glioma cells. Exp. Cell Res. 85, 217—223.
Ehrlich Y. H., Prasad K. N., Sinha P. K., Davis L. G.., Brunngraber E. G., (1978). Changes in the endogenous phosphorylation of specific proteins in subcellular fractions of cyclic AMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture. Neurochem. Res. 3, 80—85.
Eppenberger U., Talmadge K., Kung W., Bechtel E., Preisz J., Huber P., Jungmann R. A., Salokangas A. (1977). Adenosine 3',5'-cyclic-monophosphate-dependent protein kinase and cyclic-AMP-binding in human mammary tumors. FEBS. Lett. 80, 229—234.
Fausto H., Butcher F. R. (1976). Cyclic nucleotide levels in regenerating liver. Biochem. Biophys. Acta 428, 702—706.
Froehlich J. E., Rachmeler M. (1972). Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on cell proliferation. J. Cell Biol. 55, 19—31.
Gerieke D., Chandra P. (1969). Inhibition of tumor growth by nucleotide cyclic 3',5'-monophosphate. Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 350, 1469—1471.
Gidwitz-Weber M. J., Storum D. R. (1976). Solubilization of adenylate cyclase for normal and Rous sarcoma-transformed chicken embryo fibroblasts. J. Biol. Chem. 251, 7950—7951.
Goldberg M. L., Burke G. C., Morris H. P. (1975). Cyclic AMP and cyclic GMP content and binding in malignancy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 320—327.
Granner D. K. (1972). Protein kinase : Altered regulation in a hepatoma cell line deficient in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate binding protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1516—1522.
Granner D. K., Sellers L., Lee A., Butter C., Kutina L. (1975). A comparison of the uptake, metabolism and action of cyclic adenosine nucleotides in cultured hepatoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 169, 601—615.

Gutman N. S., Rae P. A., Schimmer B. P. (1978). Altered cyclic AMP-dependent protein kinase activity in a mutant adrenocortical tumor cell line. J. Cell. Physiol. **97**, 451—460.
Hait W. N., Weiss B. (1976). Increased cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in leukemic lymphocytes. Nature (London) **259**, 321—323.
Helson L. (1975). Management of disseminated neuroblastoma. Ca 25, 264—277.
Helson L., Lai K., Young C. W. (1974). Papaverine-induced changes in culture human melanoma cells. Biochem. Pharmacol. **23**, 2917—2920.
Hichie R. A., Walker C. M., Croll G. A. (1974). Decreased basal cyclic adenosine 3′, 5′-monophosphate levels in Morris hepatoma 5123 (h). Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 167—173.
Hofmann F., Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G. (1975). Comparison of adenosine 3′ : 5′-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. J. Biol. Chem., **250**, 7795—7801.
Hofmann F., Bechtel P. J., Krebs E. G. (1977). Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits in various tissue. J. Biol. Chem. **252**, 1441—1447.
Hsie A. W., Puck T. T. (1971). Morphological transformation of Chinese hamster cells by dibutyryl adenosine cyclic 3′,5′-monophosphate and testosterone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **68**, 358—361.
Imashuku S., Todo S., Amano T., Mizukawa K., Sugimoto T., Kusumoki T. (1977). Cyclic AMP in neuroblastoma ganglioneuromas and sympathetic ganglia, Experientia **33**, 1507.
Imashuku S., Fosset M. C., Green A. A. (1979). Characterization of adenosine cyclic 3′ : 5′-monophosphate-binding proteins in human neuroblastoma. Cancer Res. **39**, 3006—3013.
Insel P. A., Bourne H. R., Coffino P., Tomkins G. M. (1975). Cyclic AMP-dependent protein kinase : Pivotal role in regulation of enzyme induction and growth. Science **190**, 896—898.
Johnson G. S., Pastan I. (1972). N^6O^2-Dibutyryl adenosine 3′,5′-monophosphate induces pigment production in melanoma cells. Nature (London). New Biol. **273**, 268.
Kaminskas E., Field M., Henshaw E. C. (1976). Cyclic AMP and growth of Ehrlich ascites tumor cells. Lack of cyclic AMP elevation in nutritionally deprived cells and mechanism of retardation of growth by dibutyryl cyclic AMP. Biochim. Biophys. Acta **444**, 539—553.
Keller R. (1972). Suppression of normal and enhanced tumor growth in rats by agents interfering with intracellular cyclic nucleotides. Life Sci. **11**, 485—591.
Keller R., Keist R. (1973). Suppression of growth of P-815 mastocytoma cells in vitro by drugs increasing cellular cyclic 3′,5′-adenosine monophosphate. Life Sci. **12**, 97—105.
Kemp R. G., Hsu P. Y., Duquesnoy R. J. (1975). Ghanges in lymphoid cyclic adenosine 3′ : 5′-monophosphate metabolism during murine leukemogenesis. Cancer Res. **35**, 2440—2445.
Klier G., Shubert D., Heinemann S. (1975). Ultrastructural changes accompanying the differentiation of clonal rat nerve and glia. Neurobiology 5, 1—37.
Knapp S., Mandell A. J. (1974). Serotonin biosynthesis capacity of mouse C-1300 neuroblastoma cells in culture. Brain Res. **66**, 547—551.
Kreider J. W., Rosenthal M., Lingle N. (1973). Cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate in the control of melanoma cell replication and differentiation. J. Natl. Cancer Inst. 50, 555—558.
Kung W., Bechtel E., Geyer E., Salokangas A., Preisz J., Huber P., Torhorst J., Jungmann R. A., Talmadge K., Eppenberger U. (1977). Altered levels of cyclic nucleotides, cyclic AMP phosphodiesterase and adenylyl cyclase activities in normal, dysplastic and neoplastic human mammary tissue, FEBS Lett. **82**, 102—106.
Kuo J. F., Greengard P. (1969a). An adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein kinase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. **244**, 3417—3419.
Kuo J. F., Greengard P. (1969b). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein

kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 64, 1349—1355.
Larsen P. R., Yamashita K., Dekker A., Field J. B. (1973). Biochemical observations in functioning human thyroid adenomas Clin. Endocrinol. 36, 1009.
Lee P. C., Jungmann R. A. (1975). Ontogeny of cyclic AMP-dependent protein phosphokinase during hepatic development of rat. Biochim. Biophys. Acta 399, 265—276.
Lim R., Mitsunobu K., Li W. K. P. (1973). Maturation-stimulating effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on dissociated embryonic brain cells in culture. Exp. Cell Res. 79, 243—246.
Lohmann S. M., Walter V., Greengard P. (1978). Protein kinases in developing rat brain. J. Cyclic Nucleotide Res. 4, 445—452.
McIntyre E. H., Wintersgill C. J., Perkins J. P., Vatter A. E. (1972). The responses in culture of human tumor astrocytes and neuroblasts to N^6, O^2-dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphoric acid. J. Cell. Sci. 11, 639—667.
Majors J. (1977). Cyclic AMP, cyclic AMP-dependent protein kinase and the regulation of gene expression. Life Sci. 20, 1787—1798.
Makman M. H. (1974). Adenylate cyclase of cultured mammalian cells. Activation by catecholamines. Science 170, 1421—1423.
Matusik R. J., Hilf R. (1976). Relationship of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate to growth of dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor in rats. J. Natl, Cancer Inst. 56, 659—661.
Menahan L. A., Kemp R. G. (1976). Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in the thymus of normal and leukemic mice. J. Cyclic. Nucleotide Res. 2, 417—425.
Minton J. P., Wisenbaugh T., Matthews R. H. (1974). Elevated cyclic AMP levels in human breast-cancer tissues. J. Natl. Cancer Inst. 53, 283—284.
Minton J. P., Matthews R. H., Wisenbaugh T. W. (1976). Elevated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in human and animal tumors. J. Natl. Cancer Inst. 57, 39—41.
Monohan T. M., Marchand N. W., Fritz R. R., Abell C. W. (1975). Cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate levels and activities of related enzymes in normal and leukemic lymphocytes. Cancer Res. 35, 2540—2547.
Moonen G., Cam Y., Sensenbrenner M., Mandel P. (1975). Variability of the effects of serum-free medium, dibutyrylcyclic AMP or theophylinne on the morphology of cultured newborn rat astroblasts. Cell Tissue Res. 163, 365—372.
Moonen G., Heinen E., Goessens G. (1976). Comparative ultrastructural study on the effects of serum-free medium and dibutyryl-cyclic AMP on newborn rat astroblasts. Cell Tissue Res. 167, 221—227.
Moriyama Y., Hasegawa S., Murayama K. (1976). cAMP and cGMP changes associated with the differentiation of cultured chick embryo muscle cells. Exp. Cell Res. 101, 159—163.
Naseem S. M., Hollander V. P. (1973). Insulin reversible of growth inhibition of plasma cell tumor by prostaglandin or adenosine 3', 5'-monophosphate. Cancer Res. 33, 2909—2912.
Ney R. L., Hochella N. J., Grahami-Smith D. G. (1969). Abnormal regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and corticosterone formation in an adrenocortico carcinoma. J. Clin. Invest. 48, 1733—1739.
Niles R. M., Makarski J. S., Kurtz M. J., Rutenburg A. M. (1976). Inhibition of human prostatic epithelial cell replication by cAMP and selected analogs. Exp. Cell Res. 102, 95—103.
Niles R. M., Ludwig K. W., Makarski J. S. (1979). Differential growth inhibition in two human carcinoma cell lines by cyclic adenosine 5'-monophosphate analogs. J. Natl. Cancer Inst. 63, 909—911.
Novak E., Drummon G. I., Skala J., Hahn P. (1972). Developmental changes in cyclic AMP, protein kinase phosphorylase kinase and phosphorylase in liver, heart and skeletal muscle of the rat. Arch. Biochem. Biophys. 150, 511—518.
Ortiz J. R., Yamada T. (1975). Synergistic effects of adenosine and compounds related to adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on dedifferentiating iris epithelial cells. Differentiation 4, 135—142.

Pastan I., Johnson G. S. (1974). Cyclic AMP and the transformation of fibroblasts. Adv. Cancer Res. 19, 303—329.
Pastan I., Perlman R. L., Emmer M., Varmus H. E., DeCrombrugghe B., Chen B. P., Parks J. (1971). Regulation of gene expression in Escherichia coli by cyclic AMP. Recent Prog. Horm. Res. 27, 421—430.
Pastan I., Johnson G. S., Anderson W. B. (1975). Role of cyclic nucleotides in growth control. Annu. Rev. Biochem. 44, 491—522.
Pawalek J., Halaban R., Christie G. (1975). Melanoma cells which require cyclic AMP for growth. Nature (London) 258, 539—540.
Perry C. V., Johnson G. S., Pastan I. (1971). Adenyl cyclase in normal and transformed fibroblasts in tissue culture. Activation by prostaglandins. J. Biol. Chem. 246, 5785—5790.
Prasad K. N. (1970). X-ray-induced morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells in vitro. Nature (London) 234, 471—474.
Prasad K. N. (1973). Role of cyclic AMP in the differentiation of neuroblastoma cells in culture. In «The Role of Cyclic Nucleotides in Carcinogenesis» (H. G. Gratzner and J. Schultz, eds.), pp. 207—237. Academic Press, New York.
Prasad K. N. (1974). Abnormal regulation of cyclic AMP phosphodiesterase : Ahypothesis for the development of cancer of nerve cells. Differentiation 2, 367—369.
Prasad K. N. (1975). Differentiation of neuroblastoma cells in culture. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 50, 129—165.
Prasad K. N. (1979). Role of cyclic nucleotides in the expression of malignancy and differentiated functions in nerve cells. Adv. Med. Oncol. Res. Educ. 4, 57—73.
Prasad K. N., Gilmer K. (1974). Demonstration of dopamine adenylate cyclase in malignant neuroblastoma cells and change in sensitivy of adenylate cyclase to catechol amines in differentiated cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 71, 2525—2529.
Prasad K. N., Sinha P. K. (1978). Regulation of differentiated functions and malignancy in neuroblastoma cells in culture. In «Cell Differentiation and Neoplasia» (G. F. Saunders, ed.), pp. 111—141. Raven. New York.
Prasad K. N., Mandel B., Waymire J. C., Lees G. J., Vernadakis A., Weiner N. (1973). Basal levels of neurotransmitters synthesizing enzymes and effect of cyclic AMP agents on morphological differentiation of isolated neuroblastoma clones. Nature (London), New Biol. 241, 117—119.
Prasad K. N., Gilmer K. N., Sahu S. K., Becker G. (1975a). Effect of neurotransmitters, guanosine triphosphate and divalent ions on the regulation of adenylate cyclase activity in malignant and adenosine cyclic 3′,5′-monophosphate-induced «differentiated» neuroblastoma cells. Cancer Res. 35, 77—81.
Prasad K. N., Sinha P. K., Sahu S. K., Brown J. L. (1975b). Binding of cyclic nucleotides with soluble proteins increases in «differentiated» neuroblastoma cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 131—138.
Prasad K. N., Sinha P. K., Sahu S. K., Brown J. L. (1976). Binding of cyclic nucleotides with proteins in malignant and adenosine cyclic 3′,5′-monophosphate-induced «differentiated» neuroblastoma cells in culture. Cancer Res. 36, 2290—2296.
Prashad N., Rosenberg R. N. (1978). Induction of cyclic AMP-binding proteins by dibutyryl cyclic AMP in mouse neuroblastoma cells. Biochim. Biophys. Acta 539, 459—469.
Puck T. T. (1977). Cyclic AMP the microtubule-microfilament system and cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4491—4495.
Ramanujam M., Prasad K. N. (1979). Alterations in gene expression after chromic treatment of glioma cells in culture with methylmercuric chloride. Biochem. Pharmacol. 28, 2979—2984.
Reddi P. K., Constantinides S. M. (1972). Partial suppression of tumor production by dibutyryl cyclic AMP and theophylline. Nature (London) 238, 286—287.
Rillema J. A., Mulder J. A., Anderson L. D. (1978). Cyclic nucleotides and their associated enzymes in 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induced mammary tumors in rats. Cancer Res. 38, 741—744.

Rodgers G. M., Fisher J. W., George W. J. (1976). Elevated cyclic GMP concentrations in rabbit bone marrow culture and mouse spleen following erythropoietic stimulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 287—294.

Rozengurt E., Jimenez A. L. (1973). Role of cyclic 3′,5′-monophosphate in the early transport changes induced by serum and insulin in quiescent fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70, 3609—3612.

Ryan W. L., Heidrick M. L. (1974). Role of cyclic nucleotide in cancer. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 4, 87—116.

Sand G., Jortay A., Pochet R., Dumont J. E. (1976). Adenylate cyclase and protein phosphokinase activities in human thyroid. Comparison of normal glands, hyperfunctional nodules and carcinomas. Eur. J. Cancer 12, 447—453.

Sandor R. (1973). Inhibition of human rhabdosarcoma cell growth in agar by dibutyryl cyclic AMP. J. Natl. Cancer Inst. 51, 257—260.

Schubert D. (1975). Induced differentiation of clonal rat nerve and glial cells. Neurobiology 4, 376—387.

Schumacher M., Siedel I., Stratling W. H. (1977). Elevated cyclic GMP concentrations during estrogen-induced differentiation of the chick oviduct. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 614—620.

Seeds N. W., Gilman A. G., Amano T., Hirenberg M. W. (1970). Regulation of axon formation by clonal lines of neural tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 66, 160—167.

Seller M. J., Benson P. F. (1973). In vivo effect of adenosine 3′,5′-monophosphate on Ehrlich ascites tumor cells. Eur. J. Cancer 9, 525—526.

Shapiro D. L. (1973). Morphological and biochemical alterations in foetal rat brain cells cultured in the presence of monobutyryl cyclic AMP. Nature (London) 241, 203—204.

Sharma R. K., McLaughlin C. A., Pitot H. (1975). Cyclic nucleotide binding sites of the smooth endoplasmic reticulum for normal and neoplastic liver in the rat. Cancer Lett. 1, 61—68.

Sharma R. K., McLaughlin C. A., Pitot H. C. (1976). The binding of cyclic nucleotides to membranes of the endoplasmic reticulum of normal and neoplastic rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 175, 221—228.

Sheppard J. R., Bannai S. (1974). Cyclic AMP and cell proliferation. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (R. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 571—579. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sheth N. A., Bhide S. V., Ranadive K. J. (1974). Behavior of adenyl cyclase in mammary gland of mice susceptible and resistant to breast cancer. Indian J. Cancer 11, 177—182.

Shima S., Kawashima Y., Hirai M., Kouyama H. (1976). Studies on cyclic nucleotides in cancer. I. Adenylate cyclase, guanylate cyclase and protein kinase in the prostatic sarcoma tissue. Biochim. Biophys. Acta 444, 571—578.

Shoji M., Morris H. P., Davis C. W., Bracket N.L., Kuo J. F. (1977). Modified cyclic nucleotide system in Morris hepatoma 3924A favoring expression of cyclic GMP effect. Biochim. Biophys. Acta 500, 419—424.

Singer A. L., Sherwin R. P., Dunn A. S., Appleman M. (1976). Cyclic nucleotide phosphodiesterase in neoplastic and nonneoplastic human mammary tissue. Cancer Res. 36, 60—66.

Stevens R. H., Smithe D. D., Osborne J. W., Oberley L. W. (1976). Adenosine 3′,5′-monophosphate levels in X-ray-induced small bowel adenocarcinoma in the rat. J. Natl. Cancer Inst. 57, 43—45.

Stevens R. H., Loven D. P., Osborne J. W., Prall J. P., Lawson A. J. (1978). Cyclic nucleotide concentrations in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon adenocarcinoma. Cancer Lett. 4, 27—33.

Stevens R. H., Loven D. P., Osborne J. W., Prall J. L. (1978). Cyclic nucleotide concentrations in 1,2-dimethylhydrazine and X-ray induced rat small intestinal cancer. Cancer Lett. 4, 325—332.

Stevens R. H., Will L. A., Cole D. A., Meed E. S., Frank C. W., Donhan K. J. (1979). Cyclic nucleotide concentrations in asbestos-induced rat peritoneal mesothelioma. Environ. Res. 19, 442—448.

Sugden P. H., Corbin J. D. (1976). Adenosine 3′ : 5′-cyclic monophosphate-binding proteins in bovine and rat tissues. Biochem. J, 159, 423—437,

Yi-Chisun I., Shapiro L., Rosen O. M. (1975). A specific cyclic guanosine 3' : 5'-monophosphate-binding protein in Caulobacter crescentus. J. Biol. Chem. 250, 6181—6184.

Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T. (1962). Adenylate cyclase distribution, preparation and properties. J. Biol. Chem. **237**, 1220—1227.

Sy J., Richter D. (1972). Separation of a cyclic 3',5'-adenosine monophosphate binding protein from yeast. Biochemistry **11**, 2784—2787.

Taylor-Papadimitrious J., Karemfyllis A., Eukarpidou A., Karamanlidou G.(1975). Effect of adenosine 5'-monophosphate and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on L-cells. J. Cell Sci. 19, 305—313.

Tchao R., Leighton J. (1976). Inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on the aggregation of human breast tumor cells in line BT-20. Nature (London) 259, 220—222.

Thomas E. W., Murad F., Looney W. B., Morris H. P. (1973). Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: Concentrations in Morris hepatomas of Different growth rate. Biochim. Biophys. Acta 297, 564—567.

Tisdale M. J., Phillips B. J. (1977). cAMP binding, protein kinase activation and inhibition of cell growth. Exp. Cell Res. **104**, 135—142.

Tsuji N., Hayata Y., Sato M. (1976). Neuronal differentiation of Oat cell carcinoma in vitro by dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Cancer Lett. 1, 311—318.

Tsuzuki J., Kiger J. A., Jr. (1975). Cyclic AMP binding proteins in early embryos of Drosophila melanogaster. Biochim. Biophys. Acta 393, 225—235.

Turriff D. E., Lim R. (1979). Glia maturation factor increases cyclic GMP in glioblasts. Brain Res. **166**, 436—441.

Ueland P. M., Doskeland S. V. (1977). An adenosine 3', 5'-monophosphate-binding protein from mouse liver. J. Biol. Chem. **252**, 677—685.

Walter U., Costa M. R. C., Breakefield X. O., Greengard P. (1979). Presence of free cyclic AMP receptor protein and regulation of its level by cyclic AMP in neuroblastoma-glioma hybrid cells. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 3251—3255.

Watterson D. M., Van Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C. (1976). Calcium-dependent regulatory proteiin of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 2711—2715.

Willingham M. C., Johnson G. S., Pastan I. (1972). Control of DNA synthesis and mitosis in 3T3 cells by cyclic AMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 743—748.

Wizk R., Wicks W. D., Clay K. (1972). Effect of derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the growth, morphology and gene expression of hepatoma cells in culture. Cancer Res. 32, 1905—1911.

Yamamura H., Nishiyama K., Shimomura R., Nishizuka Y. (1973). Comparison of catalytic units of muscle and liver adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. Biochemistry **12**, 856—862.

Yang T. J., Vas S. I. (1971). Growth inhibitory effects of adenosine 3',5'-monophosphate on mouse leukemia L-5178-Y-R cells in culture. Experientia **27**, 442—444.

Yoshida M., Owada M., Toyoshima K. (1975). Strain specificity of changes in adenylate cyclase activity in cells transformed by avian sarcoma viruses. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 681—698.

Yuh K. M., Tao M. (1974). Purification and characterization of adenosine-adenosine cyclic 3',5'-monophosphate binding protein factors from rabbit erythrocytes. Biochemistry **13**, 5220—5226.

Zalin R. J., Montague W. (1974). Changes in adenylate cyclase, cyclic AMP and protein kinase levels in chick myoblasts and their relationship to differentiation. Cell 2, 103—108.

Zwiller J., Goridis C., Ciesielski-Treska J., Mandel P. (1977). Cyclic GMP in a neuroblastoma clone. Possible involvement in morphological differentiation induced by dibutyryl cyclic AMP. J. Neurochem. 29, 273—278.

8

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Прасад С. Сункара и Поту Н. Рао

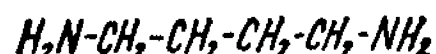
8.1. Введение 250
8.1.1. Биосинтез полиаминов 251
8.1.2. Катаболизм полиаминов 252
8.2. Полиамины во время роста и развития 252
8.3. Синтез полиаминов в нормальных и трансформированных клетках 253
8.3.1. Синтез полиаминов при вирус-индуцированной трансформации . . 253
8.3.2. Синтез полиаминов при химическом канцерогенезе 253
8.3.3. Полиамины в экспериментальных опухолях животных 254
8.3.4. Полиамины при онкологических заболеваниях человека 255
8.4. Полиамины и цикл деления клеток млекопитающих 255
8.4.1. Биосинтез во время клеточного цикла 255
8.4.2. Катаболизм во время клеточного цикла 256
8.5. Ингибиторы биосинтеза полиаминов и значение их использования в понимании роли полиаминов в регуляции клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток 259
8.5.1. Роль полиаминов в синтезе ДНК 259
8.5.2. Роль полиаминов в цитокинезе 261
8.5.3. Полиамины и дифференциальная регуляция фаз клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток 262
8.6. Выводы 264
8.7. Указатель литературы 265

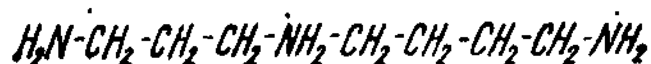
8.1. ВВЕДЕНИЕ

В естественных условиях полиамины — путресцин, спермин и спермидин — широко распространены. Структурные формулы поликатионов изображены на рис. 1.

Хотя открытие спермина в виде кристаллов в сперме человека датируется 1677 г. (Mann, 1964), его функции in vivo более или менее определенно были выяснены совсем недавно. В связи с тем что ингибиторы ферментов биосинтеза полиаминов были выделены в последнее десятилетие, проведено большое число исследований,

Рис. 1. Структурные формулы природных полиаминов.







результаты которых показали, что полиамины играют существенную роль в клеточном метаболизме, особенно в синтезе макромолекул (Cohen, 1971; Bachrach, 1973; Tabor, Tabor, 1976; Janne et al., 1978). Появился новый интерес к исследованию взаимосвязи между полиаминами и клеточным ростом (Raina, Janne, 1975; Janne et al., 1978). В этой главе мы ограничимся исследованием роли полиаминов в регуляции этапов клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток млекопитающих.

8.1.1. Биосинтез полиаминов

L-орнитин и L-метионин являются основными предшественниками полиаминов в клетках млекопитающих. Орнитин превращается в путресцин путем декарбоксилирования, в то время как метионин инкорпорируется в S-аденозил-L-метионин в присутствии АТФ, после чего он используется как донор пропиламиновой группировки для синтеза спермидина и спермина (Tabor et al., 1956; Raina, 1963; Williams-Ashman, 1972). Пути биосинтеза полиаминов в клетках животных суммированы на рис. 2.

В биосинтезе полиаминов участвуют четыре растворимых цитоплазматических энзима (Pegg, Williams-Ashman, 1968, 1969; Pegg et al., 1970; Eloranta et al., 1976). Путресцин образуется при декарбоксилировании L-орнитина, эта реакция катализируется орнитиндекарбоксилазой (ОДК) (КФ 4.1.1. 17). Декарбоксилированный аденозилметионин образуется из S-аденозилметионина в реакции, катализируемой S-аденозил-L-метионин-карбоксилиазой (S-АМКЛ; КФ 4.1.1.50). Пропиламиновая группа образующегося в результате декарбоксилирования аденозилметионина затем переносится в путресцин с помощью аминопропил-трансферазы (КФ 2.5.1.16) с образованием спермидина. Сперминсинтаза катализирует перенос другой молекулы пропиламина на спермидин, в результате чего образуется спермин.

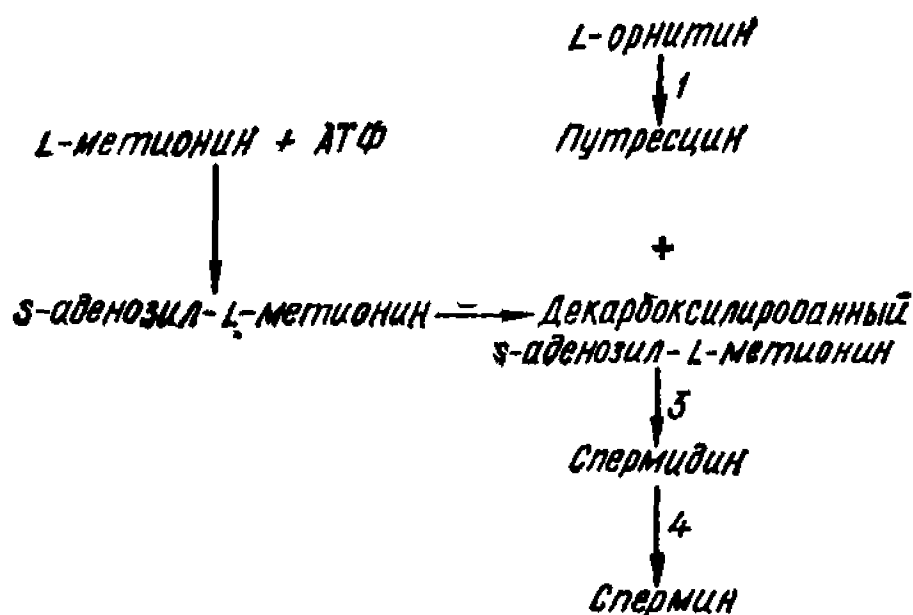


Рис. 2. Пути биосинтеза полиаминов в тканях млекопитающих. Ферментами, участвующими в биосинтезе, являются: *1* — орнитиндекарбоксилаза, *2* — S-аденозил-метионин-декарбоксилаза, *3* — спермидинсинтетаза и *4* — сперминсинтаза.

8.1.2. Катаболизм полиаминов

В расщеплении естественно появляющихся полиаминов участвуют два фермента. Фермент аминоксидаза (КФ 1.4.3.6) катализирует превращение путресцина в 3-аминопропональдегид, аммиак и перекись водорода (Zeller, 1963). Недавно Holtta (1977) обнаружил присутствие другого фермента — полиаминоксидазы. Этот фермент катализирует взаимные превращения полиаминов: расщепление спермина до спермидина и превращение спермина в путресцин. Физиологическое значение полиаминоксидазы еще не выяснено.

8.2. ПОЛИАМИНЫ ВО ВРЕМЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ

Исследования содержания полиаминов проводились с использованием развивающихся куриных эмбрионов (Raina, 1963; Caldarera et al., 1965). Создается общее впечатление, что колебания концентраций полиаминов коррелируют с концентрациями белка и РНК. Более того, повышению содержания полиаминов и нуклеиновой кислоты предшествует значительное, но кратковременное повышение активности ОДК (Russel, Snyder, 1968). Повышение активности ОДК и аденозилметионин-декарбоксилазы также наблюдается во время эмбрионального развития Xenopus laevis (Russel, 1970) и развития плода у млекопитающих (Snyder et al., 1970; Russel, 1970). Установлено, что содержание полиаминов колеблется в эмбрионах грызунов (Guha, Janne, 1976; Fozard et al., 1980). Heby и Emanuelsson (1978) сообщили, что вновь синтезированный путресцин играет специфическую роль в формировании ядрышек у эмбрионов Ophryotrocha, находящихся на ранних стадиях развития. Более того, последнее сообщение Fozard и соавт. (1980) указывает на то, что угнетение ОДК во время раннего эмбриогенеза мышей дифлюорометилорнитином приводит к остановке эмбрионального развития. Аналогичные результаты были получены при использовании конкурентного ингибитора ОДК— α-метилорнитина — во время развития эмбрионов многощетинкового червя Iophryotrocha (Heby, Emanuelsson, 1978) и яиц морских ежей (Kusonoki, Yasumasu, 1978).

Одним из первых процессов, наступающих после частичной гепатэктомии у крыс, является 100—500-кратное повышение ОДК (Russel, Snyder, 1968; Janne, Raina, 1968). Повышение активности этого фермента приводит к повышенной аккумуляции путресцина, достигающей своего максимума примерно через 4 ч после частичной гепатэктомии. Обнаружено, что спермин и спермидин после гепатэктомии аккумулируются довольно медленно. Сходные повышения активности ОДК и уровней полиаминов наблюдались в почках и сердце при их гипертрофии (Brandt et al., 1972; Russel et al., 1971; Krelhaus et al., 1976; Sogani et al., 1972) и в регенерирующей печени (Fausto, Butcher, 1976).

Молекулярный механизм гормональной стимуляции ОДК еще не ясен (Kaye et al., 1971; Kobayashi et al., 1971; Cohen et al., 1971; Nureddin, 1977). На основании явного параллелизма между стиму-

ляцией ОДК и повышением активности цАМФ-зависимой протеинкиназы недавно было высказано предположение, что индукция ОДК происходит в результате стимуляции протеинкиназы цАМФ (Russel et al., 1976). Эта гипотеза должна быть подтверждена прямыми экспериментальными данными.

8.3. СИНТЕЗ ПОЛИАМИНОВ В НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ

8.3.1. Синтез полиаминов при вирус-индуцированной трансформации

Bachrach и сотрудники (Don et al., 1975) использовали вирус-индуцированную трансформацию первичных культур фибробластов цыплят в качестве модели для изучения роли полиаминов в неопластическом росте. Инфекция куриных эмбрионов онкогенными вирусами приводит к повышенному накоплению путресцина и спермидина, в то время как инфекция различными неонкогенными вирусами не имеет никакого эффекта. Температурочувствительный мутант вируса саркомы Рауса вызывал повышение содержания клеточных полиаминов при 37 °С, но не при непермиссивной температуре 42 °С. Это наблюдение предполагает, что повышенный синтез полиаминов является результатом вирус-индуцированной трансформации, а не размножения вируса, так как вирус реплицируется одинаково хорошо при обеих температурах, но индуцирует трансформацию только при пермиссивной температуре (Don, Bachrach, 1975). В фибробластах эмбриона цыплят, инфицированных вирусом саркомы Рауса, и клетках 3Т3, инфицированных вирусом саркомы мышей, наблюдалась ранняя стимуляция ОДК (Don et al., 1975; Gazdar et al., 1976). Такое повышение активности ОДК объясняется двукратным повышением полупериода жизни фермента после клеточной трансформации (Bachrach, 1976). Эти исследования демонстрируют специфическую связь между синтезом полиаминов и трансформацией клеток. Повышение интенсивности синтеза путресцина может быть обусловлено стабилизацией ОДК или же уменьшением активности катаболического фермента — диаминоксидазы. Интересно определить, являются ли изменения активности ферментов первичным эффектом трансформации или же они вторичны как результат некоторого общего угнетения протеолиза, возникающего вследствие трансформации.

8.3.2. Синтез полиаминов при химическом канцерогенезе

Для изучения роли полиаминов при химическом канцерогенезе наиболее широко используемой системой является опухоль кожи мышей. Индукция опухолей кожи у мышей проходит в две фазы: 1-я — инициация, 2-я — промоция. Инициация достигается однократным введением субканцерогенной дозы какого-либо из многих химических веществ, за ней следует промоция с помощью повторяю-

щихся аппликаций определенных форболовых эфиров (Boutwell, 1977). Однократное применение промотирующих агентов, но не их непромотирующих аналогов приводит к временной стимуляции активности ОДК и S-АМКЛ (O'Brien et al., 1975; Yuspa et al., 1976). Непромотирующие, но гиперплазирующие агенты незначительно влияют или вообще не влияют на активность эпидермальной ОДК, что свидетельствует о возможной обусловленности повышения общим повышением белкового синтеза (O'Brien et al., 1975). Более того, угнетение промоции опухоли кожи с помощью различных ретиноидов тесно коррелирует с их способностью ингибировать индукцию ОДК (Verma, Boutwell, 1977).

При использовании модельной системы канцерогенеза печени, индуцированного диаминоазобензолом, Scalabrino и др. (1978) наблюдали, что активность ОДК и S-АМКЛ в печени повышалась биомодальным образом. Первый пик активности, наблюдаемый через 1 мес после начала скармливания канцерогена, сопровождался вторым пиком через 3 мес. С этого времени активность обоих ферментов оставалась повышенной до момента появления опухолей. Уровень путресцина при гепатоканцерогенезе также был повышен. Эти изменения ферментов, по-видимому, специфичны по отношению к печени, поскольку канцерогенная диета вызывала значительное понижение активности ОДК в почках. Какие-либо другие систематические исследования метаболизма полиаминов при хроническом канцерогенезе не проводились.

8.3.3. Полиамины в экспериментальных опухолях животных

Самые ранние исследования синтеза полиаминов в опухолях животных проводились в клетках асцитного рака Эрлиха, растущих в перитонеальной полости мышей (Siimes, Janne, 1967; Bachrach et al., 1967), где обнаружена довольно высокая концентрация спермидина по сравнению с клетками регенерирующей печени крыс (Siimes, Janne, 1967). Изменения содержания в опухолях полиаминов, особенно клеточного путресцина и ОДК, коррелируют с размножением опухолевых клеток (Anderson, Heby, 1972).

Williams-Ashman и др. (1972, 1973) проводили систематические исследования с целью выявить корреляцию между концентрациями полиаминов и скоростью роста различных трансплантируемых гепатом. Их исследования, проведенные с использованием нескольких гепатом, сильно различающихся скоростью роста, показали, что концентрация путресцина и активность ОДК существенно выше в опухолевых клетках (за исключением одной линии опухолевых клеток), чем в нормальной печени крыс. Кроме того, содержание путресцина было приблизительно в 10 раз выше в большинстве быстрорастущих гепатом. Определялись также повышенные концентрации спермидина. В противоположность этому, наблюдались очень небольшие изменения концентрации спермина в опухолевых клетках.

Marton, Heby (1974) наблюдали высокие уровни путресцина, спермидина и ферментов их биосинтеза в периферической части моз-

га при трансплантации в него химически индуцированной опухоли мозга. Высокие уровни путресцина наблюдались в глиомах крыс, индуцированных нитрозоэтимочевиной (Seiler et al., 1975). Kremzner и сотрудники (1970) обнаружили, что в опухолях мозга человека содержатся в несколько раз более высокие концентрации путресцина, чем в нормальном человеческом мозге. При перевивном лейкозе мышей L1210 обнаружено шестикратное повышение активности ОДК по сравнению с нормальной печенью мышей через 4 дня после имплантации (Russell, Levy, 1971).

8.3.4. Полиамины при онкологических заболеваниях человека

Высокие концентрации полиаминов в неопластических тканях предполагают, что повышенные количества этих веществ могут быть определены в экстраклеточных жидкостях организма.

Russell и соавт. (1971) и Russel (1971) сообщили, что экскреция полиаминов с мочой значительно выше у больных при лейкозах, лимфомах и солидных опухолях, чем у здоровых. С тех пор большое число лабораторий начали работу по измерению уровня полиаминов как маркера злокачественных заболеваний человека (Marton et al., 1976; Rennert et al., 1977; Nishioka, Romsdahl, 1974). Этот вопрос рассмотрен в исчерпывающих обзорах Savory и Shipe (1975), Bachrach (1976), Janne и соавт. (1978). По-видимому, содержание полиаминов в жидкостях организма не имеет вообще никакого или имеет небольшое значение для диагностики рака (Waalkes et al., 1975; Raina, Janne, 1975). Однако в некоторых случаях, таких, как подозрение на опухоль мозга, определение полиаминов может представлять ценность в сочетании с другими диагностическими методами (Cohen, 1977). С другой стороны, имеется много данных о том, что определение полиаминов может иметь значение при оценке эффективности химиотерапии (Russel, 1977) и прогнозе при некоторых опухолях (Cohen, 1977).

8.4. ПОЛИАМИНЫ И ЦИКЛ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

8.4.1. Биосинтез во время клеточного цикла

Как описано ранее, в результате стимуляции культур клеток сывороткой (Hogan et al., 1974; McCann et al., 1975) или инсулином (Hogan et al., 1974) интенсивность синтеза и накопления полиаминов повышается, что совпадает с началом синтеза ДНК. Это наблюдение побудило многих исследователей изучать колебания активности биосинтетических ферментов (ОДК и S-АМКЛ) во время клеточного цикла. В самых ранних исследованиях, проведенных Friedman и соавт. (1972), с использованием синхронизированных клеток китайского хомячка (клетки DON), были обнаружены три пика активности: первый — во время митоза, второй — во время переходного периода G_1/S и третий — в конце фазы S.

В синхронизированных клетках CHO определяются только два пика активности для ОДК и S-АМКЛ, совпадающие с митозом и

переходным периодом между G_1- и S-фазой (Russel, Stambrook, 1975; Heby et al., 1976). Изменения активности ферментов ассоциировались с концентрациями полиаминов, особенно путресцина и спермидина, во многих исследованных системах (Russel, Stambrook, 1975; Sunkara et al., 1977; McCann et al., 1976; Mamont et al., 1976). Всякий раз, когда индуцируется пролиферация неделящихся клеток млекопитающих, например, при стимуляции бычьих лимфоцитов конканавалином A (Fillingame et al., 1975), разведении клеток HTC (Hogan, Murden, 1974; McCann et al., 1975), возобновлении питания диплоидных фибробластов человека (Heby et al., 1975) и эмбриональных фибробластов крыс (Rupniak, Paul, 1978) свежей средой, наблюдалось быстрое накопление полиаминов в конце периода G_1 непосредственно перед началом синтеза ДНК. Связанные с определенными фазами клеточного цикла изменения активности биосинтетических ферментов и внутриклеточного содержания полиаминов предполагают, что полиамины играют важную роль в регуляции синтеза ДНК и митоза.

8.4.2. Катаболизм во время клеточного цикла

Очень мало известно о дегенерации полиаминов во время клеточного цикла у млекопитающих. Недавно Quash и сотрудники (1979) сообщили о различиях между трансформированными и нормальными клетками в плане активности ферментов аминоксидазы и полиаминоксидазы. Они наблюдали резкое уменьшение активности диаминоксидазы в клетках при достижении монослоя, и в монослойных культурах нормальных клеток активность аминоксидазы была в 2 раза выше, чем в культурах трансформированных клеток. Более высокая концентрация путресцина, выявленная в трансформированных клетках, может быть связана с пониженной скоростью его деградации (Quash et al., 1979).

Достоверно установлено, что для инициации синтеза ДНК требуются полиамины (см. раздел 5.1). Хотя во время синтеза ДНК потребность в полиаминах высока, в фазе S концентрация полиаминов относительно низка (Heby et al., 1976; Sunkara et al., 1980). Не ясно, имеют ли клетки в этой точке клеточного цикла высокую интенсивность обмена полиаминов. В настоящее время имеется совсем мало информации о характере использования или катаболизма полиаминов во время цикла деления клеток млекопитающих. В связи с этим мы исследовали не только анаболизм, но также катаболизм полиаминов во время клеточного цикла и попытались выявить связь их метаболизма с концентрацией и различными клеточными функциями, продолжающимися в это время (Sunkara et al., 1980).

Мы синхронизировали клетки с использованием N_2O (Rao, 1978). При отмене митотического блока клетки делились и проходили через клеточный цикл с высокой степенью синхронности (рис. 3). В каждой точке клеточного цикла клетки собирали и использовали для определения концентрации орнитина, интенсивности поглощения (^{14}C)-орнитина и активности ОДК и S-АМКЛ. Концентрация и скорость син-

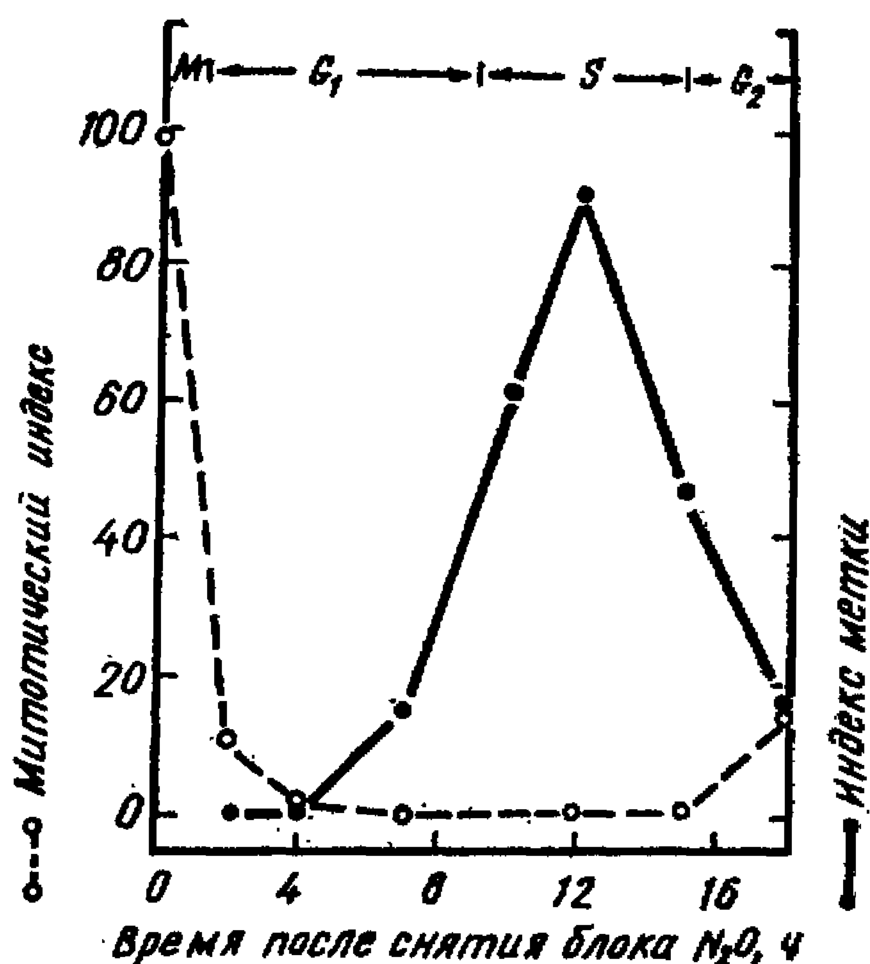


Рис. 3. Клеточный цикл синхронизированных митотических клеток HeLa после снятия нитрозоксидного блока (Sunkara et al., 1980).

теза полиаминов определялись при обработке клеток (^{14}C)-орнитином в течение 15 мин при 37 °С, экстрагировании полиаминов и разделении их на пластинках с помощью метода тонкослойной хроматографии в модификации Dion, Cohen (1972). Определяли как общее количество, так и уровень радиоактивности, ассоциированной с полиаминами (Sunkara et al., 1980).

Результаты этих исследований показывают, что внутриклеточное содержание орнитина, высокое во время митоза и начала фазы G_1, быстро снижается в конце этой фазы непосредственно перед началом синтеза ДНК, когда активность ОДК достигает пика (рис. 4 и 5). Подобное повышение концентрации орнитина наблюдалось в клетках НТС, стимулированных к пролиферации питанием свежей средой (McCann et al., 1979). В наших исследованиях также обнаружены специфичные по отношению к отдельным фазам клеточного цикла колебания активности биосинтетических ферментов — ОДК и S-АМКЛ и концентрации полиаминов во время клеточного цикла клеток HeLa, сравнимые с таковыми клеток СНО (Heby et al., 1976; Sunkara et al., 1977) и гепатомы крыс (Mamont et al., 1976).

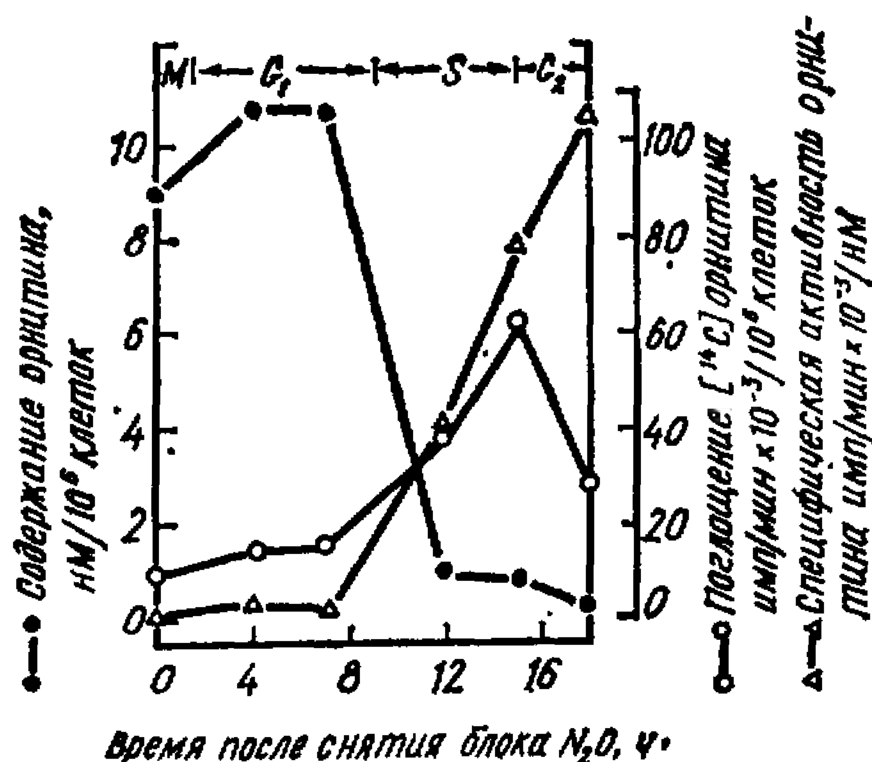


Рис. 4. Внутриклеточные уровни и поглощение меченого орнитина из среды во время клеточного цикла HeLa (Sunkara et al., 1980).

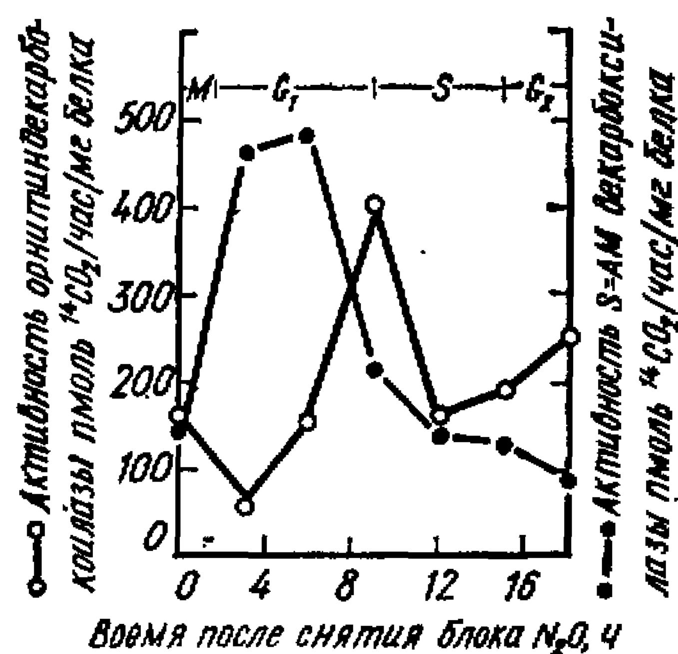


Рис. 5. Активность орнитиндекарбоксилазы и S-аденозилметиониндекарбоксилазы во время клеточного цикла HeLa (из Sunkara et al., 1980).

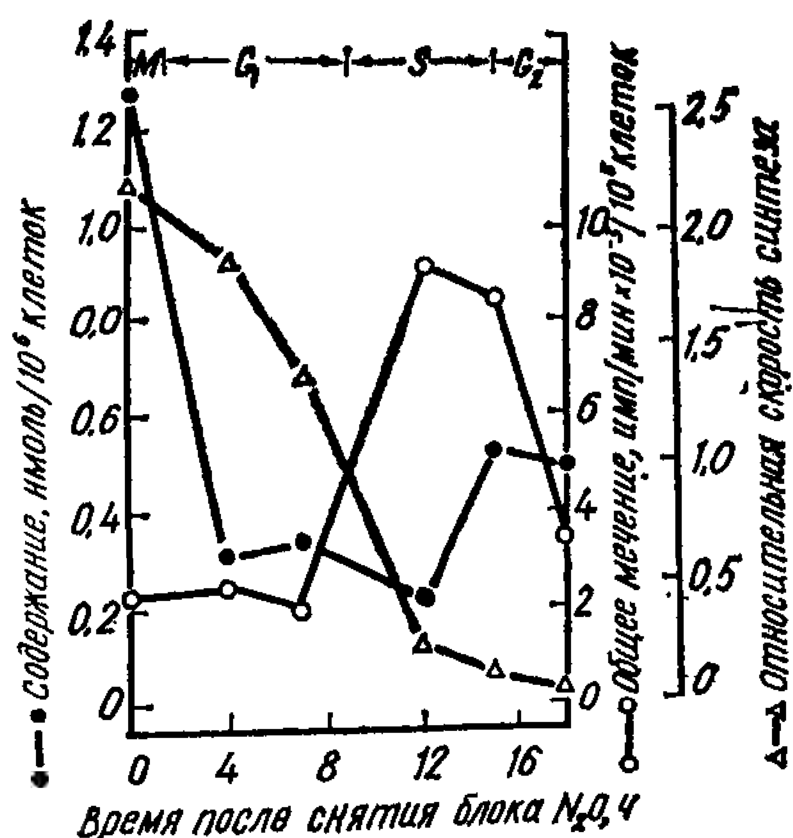


Рис. 6. **Уровень и интенсивность синтеза путресцина во время клеточного цикла HeLa (Sunkara et al., 1980).**

В нашей работе мы обнаружили, что относительная интенсивность синтеза полиаминов, особенно путресцина и спермидина, была высока во время митоза и фазы G_1, но быстро снижалась и была существенно ниже во время фазы S (рис. 6, 7 и 8). Несмотря на такое резкое уменьшение интенсивности синтеза полиаминов, содержание полиаминов было довольно высоким, особенно спермидина и спермина (см. рис. 7 и 8). Поскольку известно, что полиамины участвуют в синтезе ДНК (см. раздел 5.1), можно ожидать, что во время фазы S будет наблюдаться высокая интенсивность их синтеза. Однако наблюдаемая интенсивность синтеза полиаминов во время фазы S была примерно в 10 раз ниже, чем во время митоза или фазы G_1. Эти результаты предполагают, что интенсивность обмена полиаминов наиболее высока во время митоза и фазы G_1, а самая низкая — во время фазы S. Мы также обнаружили, что содержание путресциноксидазы в клетках HeLa высокое во время фазы G_1 и низкое при переходе из фазы G_1 в фазу S, когда начинается синтез ДНК. Таким образом, катаболизм полиаминов, вероятно, играет существенную роль в регуляции содержания полиаминов во время клеточного цикла у млекопитающих.

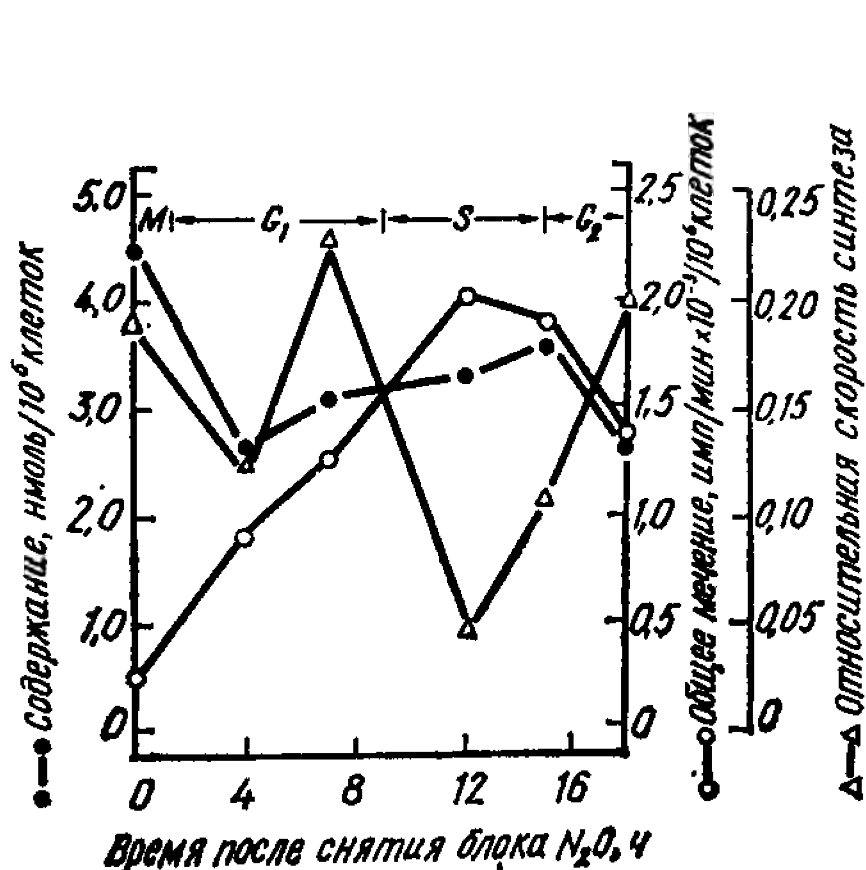


Рис. 7. Уровень и интенсивность синтеза спермидина во время клеточного цикла HeLa (Sunkara et al., 1980).

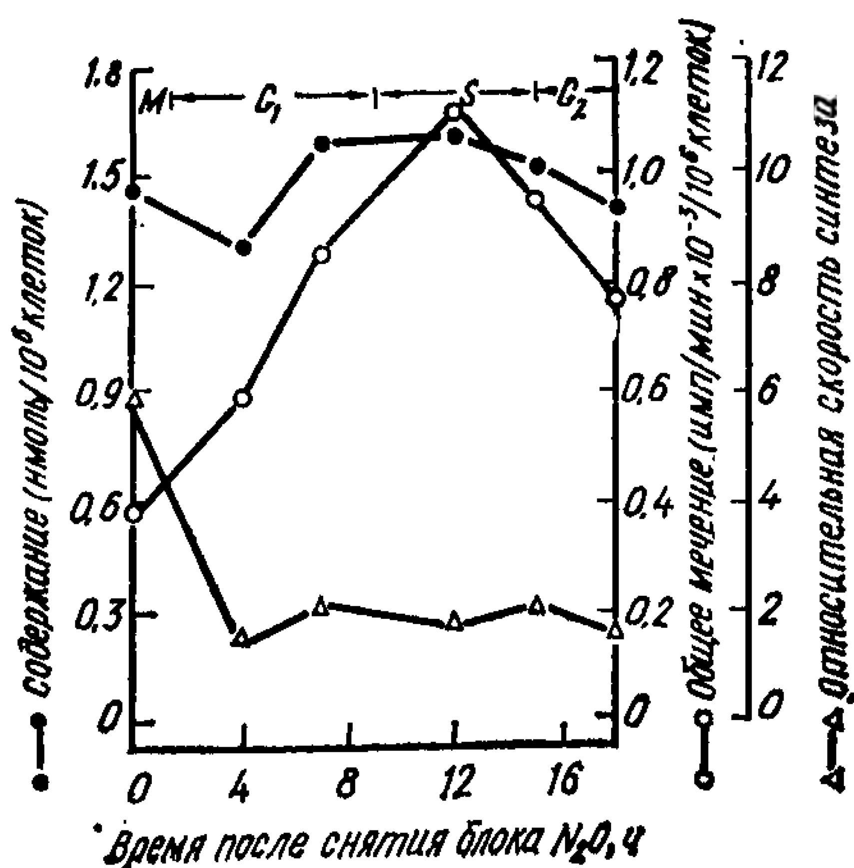


Рис. 8. Уровень и интенсивность синтеза спермина во время клеточного цикла HeLa (Sunkara et al., 1980).

8.5. ИНГИБИТОРЫ БИОСИНТЕЗА ПОЛИАМИНОВ И ЗНАЧЕНИЕ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПОНИМАНИИ РОЛИ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Несмотря на множество данных о роли полиаминов в процессах роста, имеется лишь небольшое число достоверных сведений, указывающих на то, что повышенный синтез полиаминов требуется для пролиферации клеток млекопитающих. Недавнее открытие специфических ингибиторов биосинтеза полиаминов представило окончательное доказательство участия полиаминов в пролиферации клеток.

Наиболее широко используемыми ингибиторами являются метилглиоксальбис (гуанилгидразон) (МГБГ), α-метилорнитин (α-МО) и α-дифлюорометил орнитин (ДФМО). МГБГ — известный цитотоксический агент — является мощным и специфическим ингибитором активирующейся путресцином аденозил-метионин-декарбоксилазы в клетках млекопитающих и может, таким образом, угнетать синтез спермидина и спермина (Williams-Ashman, Schenone, 1972). α-МО является мощным конкурентным ингибитором ОДК и, следовательно, может предупреждать накопление в клетках путресцина и спермидина (Abdel-Monem et al., 1974; Ellington, Honigberg, 1974). Позднее было обнаружено, что очень мощным и необратимым ингибитором ОДК является синтетический аналог ДФМО. Обработка клеток ДФМО приводит к угнетению накопления путресцина, спермидина и в некоторой степени — спермина (Metcalf et al., 1978; Mamont et al., 1978).

8.5.1. Роль полиаминов в синтезе ДНК

Роль полиаминов в синтезе ДНК была впервые установлена в результате использования МГБГ во время митогенеза лимфоцитов (Otani et al., 1974; Fillingame et al., 1975). Fillingame и сотрудники (1975) обнаружили, что МГБГ при концентрациях, ингибирующих биосинтез спермидина, также угнетал синтез ДНК в лимфоцитах, стимулированных конканавалином А. Это угнетение можно легко снять добавлением извне спермидина. Роль полиаминов в синтезе ДНК была затем подтверждена при использовании МГБГ в клетках WI38, 3T3 (Boynton et al., 1976) и CHO (Sunkara et al., 1979). Результаты этих исследований показали, что уменьшение содержания полиаминов внутри клетки угнетает инициацию репликации РНК больше, чем удлинение цепочек ДНК (Krokan, Eriksen, 1977; Sunkara et al., 1979).

Mamont и сотрудники (1976, 1978) исследовали эффект α-МО и ДФМО на рост клеток крысиной гепатомы. Эти ингибиторы ОДК сильно снижали содержание в клетках путресцина и спермидина, но не оказывали значительного влияния на содержание спермина. В обработанных клетках замедление темпа клеточного деления в результате добавления ингибиторов наступало примерно через промежуток времени, требующийся для удвоения числа клеток, после чего

Таблица 1. **Влияние ингибиторов биосинтеза полиаминов на частоту многоядерности в отдельных культурах клеток**[1]

Клеточная линия	Обработка	Частота (%)			Содержание полиаминов нмоль/6×10⁶ клеток)		
		одноядерных клеток	двухъядерных клеток	многоядерных клеток (≥3)	Путресцин	Спермидин	Спермин
CHO	Без обработки	93,0	7,0	0	1,032	12,552	10,58
	+8 мкМ МГБГ	49,0	45,5	5,5	9,184	10,264	4,68
	+10 мМ α-МО	38,5	50,5	11,0	0,112	2,96	6,128
	Без обработки	95,0	3,0	2,0	3,856	16,91	7,04
	+40 мкМ МГБГ	62,0	34,0	4,0	27,57	12,26	3,10
	+10 мМ α-МО	81,0	18,0	1,0	0,304	4,90	15,40
PA_3	Без обработки	90,5	9,0	0,5	2,64	14,26	24,91
	+40 мкМ МГБГ	50,0	49,0	1,0	3,113	7,2	6,6
	+10 мМ α-МО	65,5	34,5	0	0,504	0,768	14,52
3T3	Без обработки	87,0	12,0	1,0	3,36	21,66	3,99
	+40 мкМ МГБГ	22,0	75,0	3,0	5,94	16,18	5,02
	+10 мМ α-МО	70,0	30,0	0	0,232	3,42	14,62

[1] Экспоненциально растущие клеточные популяции обрабатывали MGBG в течение 48 ч или α-МО в течение 72 ч, затем определяли количество полиаминов и частоту многоядерности (Sunkara et al., 1979).

следовало угнетение синтеза ДНК. Немедленное снятие угнетения роста при добавлении полиаминов низкой концентрации указывает на их прямую роль в процессах роста (Mamont et al., 1976, 1978).

Таким образом, ясно, что полиамины имеют существенное значение для оптимального темпа репликации ДНК. К такому же выводу пришли многие другие исследователи при изучении различных биологических систем и во многих случаях со структурно различными ингибиторами биосинтеза полиаминов (Inuoue et al., 1975; Poso, Janne, 1976; Sunkara et al., 1977; Wiegand, Pegg, 1978).

8.5.2. Роль полиаминов в цитокинезе

При исследовании влияния МГБГ и α-МО на прогрессию клеточного цикла клеток HeLa и CHO мы отмечали высокую частоту появления в обработанных культурах двухъядерных клеток. Чтобы лучше понять этот феномен, было предпринято детальное исследование (Sunkara et al., 1979). Результаты этого исследования показали значительное повышение частоты двухъядерных клеток, когда синтез полиаминов угнетался добавлением МГБГ или α-МО во всех исследованных линиях клеток (табл. 1). Кроме того, в результате исследований, проведенных с синхронизированными клетками HeLa, обнаружено, что в обработанных МГБГ культуральных клетках, находящихся на стадии митоза, количество спермидина и спермина содержится на 40 % ниже, чем в клетках необработанной культуры. Это понижение содержания полиаминов ассоциируется со значительным повышением частоты определения двухъядерных клеток (табл. 2). Однако

Таблица 2. **Влияние обработки МГБГ на частоту многоядерности в синхронизированных митотических клетках HeLa** [1]

Обработка	Частота (%)			Содержание полиаминов в митотических клетках (нмоль/6×10^6 клеток)		
	одноядерных клеток	двухъядерных клеток	многоядерных (≥3) клеток	Путресцин	Спермидин	Спермин
Необработанные контрольные митотические клетки	81,0	14,33	5,6	7,152	24,792	12,488
Контрольные митотические клетки + МГБГ (10 мкг/мл)	82,5	15,0	3,5			
Митотические клетки из культур, обработанных МГБГ	46,3	46,3	7,3	12,968	15,536	7,968
МГБГ-митоз + спермидин (100 мкМ)	85,5	10,0	4,5			
МГБГ-митоз + спермин (25 мкМ)	76,3	20,6	4,0			

[1] Sunkara и соавт. (1979).

добавление к митотически делящимся клеткам, выделенным из обработанных МГБГ культур, спермидина или спермина снижало частоту двухъядерных клеток до контрольного уровня. Мы также обнаружили, что уменьшение содержания полиаминов ассоциировано не только с повышением частоты двухъядерных клеток, но также с дезорганизацией микрофиламент, как это показано с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием антител, специфических к актину. Однако это только косвенные данные о роли полиаминов в поддержании структурной и функциональной целостности сократительного кольца, существенного для нормального цитокинеза. Тот факт, что экзогенное добавление полиаминов, в частности спермидина, может снять угнетение цитокинеза, предполагает, что спермидин может играть роль в структуре и/или функции микрофиламент во время цитокинеза и деления.

8.5.3. Полиамины и дифференциальная регуляция фаз клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток

Связанные с клеточным циклом колебания наблюдаемого содержания полиаминов, особенно их пик в конце фазы G_1, и потребность в полиаминах для оптимального темпа репликации ДНК демонстрируют важную роль этих физиологических катионов в переходе клеток из фазы G_1 в фазу S. Действительно, результаты недавно проведенных исследований показывают, что угнетение с помощью МГБГ биосинтеза полиаминов в большом числе линий нормальных клеток, таких, как WI38, клетки эмбрионов крыс, 3Т3-клетки мышей и фибробласты кожи человека (PA_2) вызывает остановку клеточного цикла в фазе G_1 (Boynton et al., 1976; Rupniak, Paul, 1978; Sunkara et al., 1979). Эта остановка легко снимается добавлением спермидина или спермина. Обработка трансформированных клеток (HeLa, SV-3T3 и CHO) МГБГ и ДФМО приводит к остановке цикла большинства клеток в фазе S (Rupniak, Paul, 1978; Sunkara et al., 1979), как показано в табл. 3 и 4. В данном исследовании мы обрабатывали экспоненциально растущие нормальные (фибробласты кожи человека линии PA_2, клетки 3Т3 мышей) и трансформированные (HeLa, SV-3T3) клетки МГБГ (40 мкМ) или ДФМО (2,5 мкМ) в течение 48 или 96 ч соответственно. В конце этого периода клетки собирали и гибридизировали с синхронизированными митотическими клетками HeLa с помощью вируса Сендаи, инактивированного ультрафиолетовым облучением с целью индукции преждевременной конденсации хромосом (ПКХ) (Johnson, Rao, 1970). Готовили препараты хромосом, в которых определяли частоту появления различных типов ПКХ, т. е. специфических фаз (G_1, S и G_2) (Rao et al., 1977). Результаты показывают, что угнетение синтеза путресцина и спермидина приводило к блоку фазы G_1 в большой популяции нормальных клеток, в то время как большинство трансформированных клеток останавливались в фазе S. Эти данные предполагают, что в фазе G_1 специфический процесс, необходимый для перехода клеток в фазу S, проходит с участием полиаминов. Нормальные клетки распо-

Таблица 3. **Дифференциальное действие обработки МГВГ на прохождение клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток** [1]

Клеточная линия	Обработка	Частота (%) ПКХ в фазе			Содержание полиаминов (нмоль/6 × 10^6 клеток)		
		G_1	S	G_2	Путресцин	Спермидин	Спермин
PA_2	Контроль	54,0	34,0	12,0	2,64	14,26	24,91
	+ МГБГ (40 мкМ)	90,0	7,0	3,0	3,113	7,2	6,60
3Т3	Контроль	42,0	53,0	5,0	3,36	21,66	3,99
	+ МГБГ (40 мкМ)	83,0	8,0	9,0	5,94	16,18	5,02
SV 3T3	Контроль	37,0	59,0	4,0	1,208	29,104	10,76
	+ МГБГ (40 мкМ)	18,0	78,0	4,0	2,25	11,63	7,10
HeLa	Контроль	49,5	33,0	17,5	3,856	16,91	7,04
	+ МГБГ (40 мкМ)	46,0	50,0	4,0	27,57	12,26	3,10

[1] Экспоненциально растущие клетки культуры обрабатывались МГБГ в течение 48 ч. В конце обработки часть клеток гибридизировали с митотическими клетками СНО и определяли частоту различных типов ПКХ. В каждом случае подсчитывали 100 ПКХ. Остальную часть обработанных клеток использовали для определения полиаминов (Sunkara et al., 1979).

знают этот контрольный сигнал и останавливаются в фазе G_1. Трансформированные клетки не реагируют на уменьшенное содержание полиаминов, однако, несмотря на продолжающийся клеточный цикл, синтез ДНК в большинстве клеток не завершается, и, следовательно, они останавливаются в фазе S. Такое дифференциальное действие угнетения биосинтеза полиаминов на клеточный цикл нормальных

Таблица 4. **Дифференциальное действие обработки ДФМО на клеточный цикл нормальных и трансформированных клеток** [1]

Клеточная линия	Обработка	Число клеток (×10^6)	Частота (%) ПКХ в фазе			Содержание полиаминов (нмоль/10^6 клеток)		
			G_1	S	G_2	Путресцин	Спермидин	Спермин
WI38	Контроль	5,4	42,0	51,0	7,0	0,704	2,896	3,36
	ДФМО	2,3	70,9	29,1	0	0	0,016	1,80
3T3	Контроль	1,04	46,0	44,0	10,0	0,56	3,61	0,665
	ДФМО	0,46	60,0	26,7	13,3	0	0,816	0,384
HeLa	Контроль	5,16	52,0	40,0	8,0	0,224	2,36	1,272
	ДФМО	1,50	24,0	74,0	2,0	0	0,136	1,104
SV 3T3	Контроль	3,72	38,0	56,0	6,0	0,852	3,224	0,892
	ДФМО	2,10	6,0	84,0	10,0	0	0,20	1,008
2RA	Контроль	6,10	45,0	50,0	5,0	0,608	3,936	11,65
	ДФМО	2,2	20,0	76,0	4,0	0	0,640	9,79

[1] Экспоненциально растущие клетки (0,25×10^6) обрабатывали ДФМО (2,5 мМ) в течение 96 ч. В конце обработки клетки собирали, подсчитывали и гибридизировали с митотическими клетками HeLa. Определяли частоту различных типов ПКХ. Из Sunkara и соавт. (неопубликованные данные).

и трансформированных клеток может быть использовано для избирательного разрушения последних.

Идеальный химиотерапевтический режим подразумевает селективное разрушение опухолевых клеток препаратами при минимальном их действии на популяцию нормальных клеток организма. Однако большинство противоопухолевых химиотерапевтических препаратов не дифференцируют нормальные и опухолевые клетки, вследствие чего их использование приводит к значительной деструкции быстро пролиферирующих нормальных клеток in vivo, таких, как клетки костного мозга и эндотелия кишечника. Дифференциальная остановка нормальных и опухолевых клеток в фазах G_1 и S, соответственно, путем обработки МГБГ и ДФМО может быть использована для избирательного уничтожения опухолевых клеток препаратами, специфическими по отношению к фазе S, такими, как Ara — C и гидроксимочевина. Недавно Rupniak и Paul (1980) обнаружили, что комбинированием МГБГ и гидроксимочевины можно избирательно разрушать трансформированные клетки SV3T3. В результате предварительной обработки МГБГ растущих культур клеток 3T3 и SV3T3 и последующей — гидроксимочевиной — цитотоксическим препаратом, специфическим по отношению к фазе S,— авторы добились высокоизбирательного уничтожения размножающихся трансформированных SV клеток 3T3. В противоположность этому, нормальные клетки 3T3 были защищены от цитотоксического действия гидроксимочевины благодаря индуцированной МГБГ остановке роста клеток в нечувствительной фазе G_1.

8.6. ВЫВОДЫ

Основываясь на имеющихся экспериментальных данных, можно сказать, что полиамины, вероятно, играют важную роль в пролиферации нормальных и трансформированных клеток. Хотя факт потребности репликации ДНК в полиаминах установлен, молекулярные процессы, для которых существенны полиамины, все еще не выявлены. Имеется небольшое число данных, предполагающих, что катаболические ферменты путресциноксидаза и полиаминоксидаза регулируют содержание полиаминов во время клеточного цикла. Еще не установлено, играют ли эти полиамины важную роль в поддержании высоких концентраций полиаминов, наблюдаемых в трансформированных клетках. Было бы интересно выяснить, происходит ли раннее угнетение специфической активности диамин- и полиаминоксидаз при вирусном и химическом канцерогенезе.

Экспериментальные данные указывают, что угнетение синтеза путресцина и спермидина приводит к остановке в фазе G_1 роста большой популяции нормальных клеток, в то время как рост трансформированных клеток блокируется в фазе S клеточного цикла. Дифференциальное влияние малого количества полиаминов на этапы клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток может быть использовано для дифференциального разрушения трансформированных клеток препаратами, специфическими к фазе S, такими, как

Ara—C и гидроксимочевина. Это возможно при последовательной обработке МГБГ и гидроксимочевиной культивируемых клеток 3T3 и SV3T3 (Rupniak, Paul, 1980). Эти исследования иллюстрируют возможность избирательного уничтожения опухолевых клеток в результате использования биохимической основы, отражающей различия регуляции полиаминами клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток. Было бы интересно узнать, окажутся ли полезными эти результаты для разрабатывающихся методик терапии злокачественных заболеваний человека.

8.7. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Abdel-Monem M. M., Newton N. E., Weeks C. E. (1974). Inhibitors of polyamine biosynthesis. 1. methyl-(+)-ornithine, an inhibitor of ornithine decarboxylase. J. Med. Chem. 17, 447—451.

Anderson G., Heby O. (1972). Polyamine and nucleic acid concentrationis in Ehrlich ascites carcinoma cells and liver of tumor-bearing mice at various stages of tumor growth. J. Natl. Cancer Inst. 48, 165—172.

Bachrach U. (1973). «Function of Naturally Occurring Polyamines.» Academic Press, New York.

Bachrach U. (1976a). Polyamines as chemical markers of malignancy. Ital. J. Biochem. 25, 77—93.

Bachrach U. (1976b). Polyamines and neoplastic growth: Stabilization of ornithine decarboxylase during transformation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1008—1013.

Bachrach U., Bekierkunst A., Abzug S. (1967). The occurrence of putrescine, spermidine and spermine in Ehrlich ascites cells. Isr. J. Med. Sci. 3, 474—477.

Boutwell R. K. (1977). The role of the induction of ornithine decarboxylase in tumor promotion. In «Origins of Human Cancer» (H. H. Hiatt, J. D. Watson and J. A. Winsten, eds.), pp. 773—783. Cold Spring Harbor Lab., Cold. Spring Harbor, New York.

Boynton A. L., Whitfield J. F., Isaacs R. J. (1976). A possible involvement of polyamines in the initiation of DNA synthesis by human WI 38 and mouse BALB/3T3 cells. J. Physiol. 89, 481—488.

Brandt J. T., Pierre D. A., Fausto N. (1972). Ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis during kidney hypertrophy. Biochim. Biophys. Acta 279, 184—193.

Caldarera C. M., Barbiroli B., Moruzzi G. (1965). Polyamines and nucleic acids during development of the chcik embryo. Biochem. J. 97, 84—88.

Cohen S. S. (1971). «Introduction to Polyamines.» Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Cohen S. S. (1977). Conference on polyamines in cancer. Cancer Res. 37, 939—942.

Cohen S., O'Malley B. W., Stastny M. (1970). Estrogenic induction of ornithine decarboxylase in vivo and in vitro. Science 170, 336—338.

Dion A. D., Cohen S. S. (1972). Polyamine stimulation of nucleic acid synthesis in an uninfected and phage-infected polyamine auxotroph of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 213—217.

Don S., Bachrach U. (1975). Polyamine metabolism in normal and virus-transformed chick embryo fibroblasts. Cancer Res. 35, 3618—3622.

Don S., Wiener H., Bachrach U. (1975). Specific increase in polyamine levels in chick embryo cells transformed by Rous sarcoma virus. Cancer Res. 35, 194—198.

Ellington J. J., Honigberg I. L. (1974). The synthesis of 2-methyl-proline and 2-methylornithine. J. Org. Chem. 39, 104—106.

Eloranta T. O., Maenpaa P. H., Raina A. (1976). Synthesis of hepatic polyamines, ribonucleic acid and S-adenosylmethionine in normal and oestrogen-treated chicks. Biochem. J. 154, 95—103.

Fausto N., Butcher F. R. (1976). Cyclic nucleotide levels in regenerating liver. Biochim. Biophys. Acta **428**, 702—706.
Fillingame R. H., Jorstad C. M., Morris D. R. (1975). Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 4042—4045.
Fozard J. R., Part M. L., Prakash N. J., Grove J., Schechter P. J., Sjoerdsma A., Koch-Weser J. (1980).— Ornithine decarboxylase: An essential role in early mammalian embryogenesis. Science **208**, 505—508.
Friedman S. J., Bellantone R. A., Canellakis E. (1972). Ornithine decarboxylase activity in synchronously growing Don C cells. Biochim. Biophys. Acta **261**, 188—193.
Gazdar A. F., Stull H. B., Kilton L. J., Bachrach U. (1976). Increased ornithine decarboxylase activity in murine sarcoma virus infected cells. Nature (London) 262, 696—698.
Guha S. K., Janne J. (1976). The synthesis and accumulation of polyamines in reproductive organs of the rat during pregnancy. Biochim. Biophys. Acta **437**, 244—252.
Heby O., Emanuelsson H. (1978). Possible involvement of putrescine in nucleolar formation in early embryos. Cell Tissue Res. **194**, 103—114.
Heby O., Marton L. J., Zardi L., Russell D. H., Baserga R. (1975). Changes in polyamine metabolism in W138 cells stimulated to proliferate. Exp. Cell. Res. **90**, 8—14.
Heby O., Gray J. R., Lindl P. A., Marton *L. J., Wilson C. B.* (1976). Changes in L-ornithine decarboxylase activity during the cell cycle. Biochem. Biophys. Res. Commun. **71**, 99—105.
Hogan B. L. M., Murden S. (1974). Effect of growth conditions on the activity of ornithine decarboxylase in cultured hepatoma cells. I. Effect of amino acid supply. J. Cell. Physiol. 83, 345—351.
Hogan B. L. M., McIllhinney A., Murden S. (1974a). Effect of growth conditions on the activity of ornithine decarboxylase in cultured hepatoma cells. II. Effect of serum and insulin. J. Cell. Physiol. **83**, 353—357.
Hogan B., Shields R., Curtis D. (1974b). Effect of cyclic nucleotides on the induction of ornithine decarboxylase in BHK cells by serum and insulin. Cell **2**, 229—233.
Holtta E. (1977). Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: Purification and properties of polyamine oxidase. Biochemistry **16**, 91—100.
Inoue H., Kato Y., Takigawa M., Adachi K., Takeda Y. (1975). Effect of DL-α-hydrazine-amino-valeric acid, and inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine metabolism in isoproterenol-stimulated mouse parotid glands. J. Biochem. (Tokyo) **77**, 879—893.
Janne J., Raina A. (1968). Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver: Relation to increased ornithine decarboxylase activity. Acta Chem. Scand. **22**, 1349—1351.
Janne J., Poso H., Raina A. (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. Biochim. Biophys. Acta **473**, 241—293.
Johnson R. T., Rao P. N. (1970). Mammalian cell fusion. Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature (London) **226**, 717—722.
Kaye A. M., Icekson I., Lindner H. R. (1971). Stimulation by estrogens of ornithine and S-adenosylmethionine decarboxylase in the immature rat uterus. Biochim. Biophys. Acta 252, 150—159.
Kobayashi Y., Kupelian J., Maudsley D. V. (1971). Ornithine decarboxylase stimulation in rat ovary by luteinizing hormone. Science **172**, 379—380.
Krelhaus W., Gibson L., Harris P. (1976). The effects of hypoxia, hypertrophy and diet on rat myocardial ornithine carboxylase activity. In «Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism» (P. Harris, R. J. Bing and A. Fleckenstein, eds.), Vol. **7**, pp. 85—90. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.
Kremzner L. T., Barrett R. E., Terrano J. J. (1970). Polyamine metabolism in the central and peripheral nervous system. Ann. N. Y. Acad. Sci. **171**, 735—748.

Krokan H., Eriksen A. (1977). DNA synthesis in HeLa cells and isolated nuclei after treatment with an inhibitor of spermidine synthesis, methyl glyoxal bis (guanylhydrazone). Eur. J. Biochem. **72**, 501—508.

Kusonoki S., Yasumasu I. (1978). Inhibitory effect of hydrazino-ornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. Dev. Biol. **67**, 336—345.

McCann P. O., Tardif C., Mamont P. S., Schuber F. (1975). Biphasic induction of ornithine decarboxylase and putrescine levels in growing HTC cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **64**, 336—341.

McCann P. O., Hornsperger I. M., Seiler N. (1979). Regulatory interrelations between GABA and polyamines. II. Effect of GABA on ornithine decarboxylase and putrescine levels in cell culture. Neurochem. Res. **4**, 437—447.

Mamont P. S., Bohlen P., McCann P. P., Bey P., Schuber F., Tardif C. (1976). Methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 1626—1630.

Mamont P. S., Duchesne M. C., Grove J., Bey P. (1978). Anti-proliferative properties of difluoromethyl ornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **81**, 58—66.

Mann T. (1964). «The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.» Methuen, London.

Marton L. J., Heby O. (1974). Polyamine metabolism in tumor, spleen and liver of tumor-bearing rats. Int. J. Cancer **13**, 619—628.

Marton L. J., Heby O., Levin V. A., Lubich W. P., Crafts D. C., Wilson C. B. (1976). The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumors. Cancer Res. **36**, 973—977.

Metcalf B. W., Bey P., Danzin C., Jung M. J., Casara P., Vevert J. P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E. C. 4. 1. 1. 17) by substrate and product analogues. J. Am. Chem. Soc. **100**, 2551—2553.

Nishioka K., Romsdahl M. M. (1974). Elevation of putrescine and spermidine in sera of patients with solid tumors. Clin. Chim. Acta **57**, 155—161.

Nureddin A. (1977). Ovarian ornithine decarboxylase induction: A specific and rapid in vivo bioassay of LH. Biochem. Med. **17**, 67—79.

O'Brien T. G., Simsiman R. C., Boutwell R. K. (1975). Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis and their specificity for tumor promotion. Cancer Res. 35, 2426—2433.

Otani S., Mizoguchi Y., Matsui I., Morisawa S. (1974). Inhibition of DNA synthesis by methyl-glyoxal bis (guanylhydrazone) during lymphocyte transformation. Mol. Biol. Rep. **1**, 431—436.

Pegg A. E., Williams-Ashman H. G. (1968). Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat. Biochem. J. **108**, 533—539.

Pegg A. E., Williams-Ashman H. G. (1969). On the role of S-adenosyl methionine in the biosynthesis of spermidine by rat prostate. J. Biol. Chem. **244**, 682—693.

Pegg A. E., Lockwood D. H., Williams-Ashman H. G. (1970). Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymatic synthesis during androgen-induced prostatic growth. Biochem. J. **117**, 17—31.

Poso H., Janne J. (1976). Inhibition of polyamine accumulation and deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rat liver. Biochem. J. 158, 485—488.

Quash G., Keolouangkhot T., Gazzolo L., Ripoll H., Saez S. (1979). Diamine oxidase and polyamine oxidase activities in normal and transformed cells. Biochem. J. **177**, 275—282.

Raina A. (1963). Studies on the determination of spermidine and spermine and their metabolism in the developing chick embryo. Acta Physiol. Scand., Suppl. **218**, 1—81.

Raina A., Janne J. (1975). Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. Med. Biol. 53, 121—147.

Rao P. N. (1968). Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitroux oxide. Science **160**, 774—775.

Rao P. N., Wilson B., Puck T. T. (1977). Premature chromosome condensation and cell cycle analysis. J. Cell. Physiol. 91, 131—141.

Rennert O. M., Lawson D. L., Shukla J. B., Miale T. D. (1977). Cerebrospinal fluid polyamine monitoring in central nervous system leukemia. Clin. Chim. Acta 75, 365—369.

Rupniak H. T., Paul D. (1978a). Inhibition of spermidine and spermine synthesis leads to growth arrest of rat embryo fibroblasts in G_1. J. Cell. Physiol. **94**, 161—170.

Rupniak H. T., Paul D. (1978b). Regulation of the cell cycle by polyamines in normal and transformed fibroblasts. Adv. Polyamine Res. **1**, 117—126.

Rupniak H. T., Paul D. (1980). Selective killing of transformed cells by exploitation of their defective cell cycle control by polyamines. Cancer Res. **40**, 293—297.

Russell D. H. (1970). Discussion: Putrescine and spermidine biosynthesis in growth and development. Ann. N. Y. Acad. Sci. **171**, 772—782.

Russell D. H. (1971). Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. Nature (London), New Biol. **233**, **144**.

Russell D. H. (1977). Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics. Clin. Chem. **23**, 22—27.

Russell D. H., Levy C. C. (1971). Polyamine accumulation and biosynthesis in a mouse L1210 leukemia. Cancer Res. **31**, 248—251.

Russell D. H., Snyder S. H. (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo and various tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **60**, 1420—1427.

Russell D. H., Stambrook P. J. (1975). Cell cycle specific fluctuations in adenosine 3′ : 5′-cyclic monophosphate and polyamines of Chinese hamster cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**, 1482—1486.

Russell D. H., Levy C. C., Schimpff S. C., Hawk I. A. (1971a). Urinary polyamines in cancer patients. Cancer Res. **31**, 1555—1558.

Russell D. H., Shiverick K. T., Hamrell B. B., Alpert N. R. (1971b). Polyamine synthesis during initial phases of stress-induced cardiac hypertrophy. Am. J. Physiol. **221**, 1287—1291.

Russell D. H., Byus C. V., Manen C. A. (1976). Proposed model of major sequential biochemical events of a trophic response. Life Sci. **19**, 1297—1306.

Savory J., Shipe J. R. (1975). Serum and urine polyamines in cancer. Ann. Clin. Lab. Sci. **5**, 110—114.

Scalabrino G., Poso H., Holtta E., Hannonen P., Kallio A., Janne J. (1978), Synthesis and accumulation of polyamines in rat liver during chemical carcinogenesis. Int. J. Cancer **21**, 239—245.

Seiler N. S., Lamberty U., Al-Therib J. J. (1975). Acetyl-coenzyme A: 1,4-Diaminobutane N-acetyl-transferase: Activity in rat brain during development, in experimental brain tumours and in brains of fish of different metabolic activity. J. Neurochem. **24**, 797—800.

Siimes M., Janne J. (1967). Polyamines and their biosynthesis in Ehrlich ascites cells. Acta Chem. Scand. **21**, 815—817.

Snyder S. H., Kreuz D. S., Medina V. J., Russell D. H. (1970). Polyamine synthesis and turnover in rapidly growing tissues. Ann. N. Y. Acad. Sci. **171**, 749—771.

Sogani R. K., Matsushita S., Mueller J. F., Raben M. S. (1972). Stimulation of ornithine decarboxylase activity in rat tissues by growth hormone and by serum growth factor from rats infected with spargana of Spirometra mansonoides. Biochim. Biophys. Acta **279**, 377—386.

Sunkara P. S., Rao P. N., Nishioka K. (1977). Putrescine biosynthesis in mammalian cells: Essential for DNA synthesis but not for mitosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. **74**, 1125—1133.

Sunkara P. S., Pargac M. B., Nishioka K., Rao P. N. (1979a). Differential effects of inhibition of polyamine biosynthesis on cell cycle traverse and structure of the prematurely condensed chromosomes of normal and transformed cells. J. Cell. Physiol. **98**, 451—458.

Sunkara P. S., Rao P. N., Nishioka K., Brinkley B. R. (1979b). Role of polyamines in cytokinesis of mammalian cells. Exp. Cell. Res. **119**, 63—68.

Sunkara P. S., Ramakrishna S., Nishioka K., Rao P. N. (1981). The relationship between levels and rates of synthesis of polyamines during mammalian cell cycle. Life Sci. (in press).

Tabor C. W., Tabor H. (1976). 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. Annu. Rev. Biochem. **45**, 285—306.
Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W. (1956). Biosynthesis of spermidine and spermine from putrescine. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **15**, 367.
Verma A. K., Boutwell R. K. (1977). Vitamin A acid (retinoic acid), a potent inhibitor of 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. Cancer Res. **37**, 2196—2201.
Waalkes T. P., Gehrke C. W., Tormey D. C., Zumwalt R. W., Hueser J. N., Kuo K. C., Lakings D. B., Ahmann D. L., Moertel C. G. (1975). Urinary excretion of polyamines by patients with advanced malignancy. Cancer Chemother. Rep. **59**, 1103—1116.
Weigand L., Pegg A. E. (1978). Effects of inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase and ornithine decarboxylase on DNA synthesis in rat liver after partial hepatectomy. Biochim. Biophys. Acta **517**, 169—180.
Williams-Ashman H. G., Schenone A. (1972). Methyl glyoxal bis (guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. Biochem. Biophys. Res. Commun. **46**, 288—295.
Williams-Ashman H. G., Coppoc G. L., Weber G. (1972a). Imbalance in ornithine metabolism in hepatomas of different growth rates as expressed in formation of putrescine, spermidine and spermine. Cancer Res. **32**, 1924—1932.
Williams-Ashman H. G., Pegg A. E., Lockwood D. H. (1972b). Mechanisms and regulation of polyamine and putrescine biosynthesis in male genital glands and other tissues of mammals. Adv. Enzyme Regul. **7**, 291—323.
Williams-Ashman H. G., Coppoc G. L., Schenone A., Weber G. (1973). Aspects of polyamine biosynthesis in normal and malignant eukaryotic cells. In «Polyamines in Normal and Neoplastic Growth» a 1 (D. H. Russell, ed.), pp. 181—197, Raven, New York.
Yuspa S. H., Lichti U., Ben T., Patterson E., Hennings H., Slaga T. J., Colburn N., Kelsey W. (1976). Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures. Nature (London) **262**, 402—404.
Zeller E. A. (1963). Diamine oxidases. In «The Enzymes» (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, eds.), Vol. **8**, pp. 331—335. Academic Press, New York.

9

ОСОБЕННОСТИ НОРМАЛЬНЫХ, ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ, ОБНАРУЖЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Паула Т. Билл, Бонни Б. Эш, Даниел Медина и Карлтон Хэзлвуд

9.1. Введение 270
9.1.1. Важность воды для живых систем 270
9.1.2. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 272
9.1.3. Определение различий свойств воды в нормальных и трансформированных тканях 275
9.1.4. Возможность использования ЯМР для изучения трансформации 277
9.2. «Системное влияние» трансформированных клеток на свойства воды в других тканях и сыворотке 278
9.2.1. Не пораженные опухолью органы животных-опухоленосителей 278
9.2.2. Сыворотка животных-опухоленосителей 281
9.2.3. Заключение 284
9.3. Особенности свойств воды в нормальных, предопухолевых и опухолевых тканях, обнаруженные с помощью ЯМР 284
9.3.1. Предопухолевые и опухолевые ткани молочных желез мышей . . . 285
9.3.2. Нормальные, фиброзные, фиброкистозные, малигнизированные ткани опухолей молочных желез человека 287
9.4. Особенности первичных клеточных культур нормальной, предопухолевой и опухолевой тканей молочной железы мышей, обнаруженные по времени релаксации ЯМР воды 289
9.5. Указатель литературы 297

9.1. ВВЕДЕНИЕ

9.1.1. Важность воды для живых систем

Признание важной роли воды в жизни было отмечено еще древними греками, которые включили ее в число трех первичных элементов — «земля, огонь и вода». Ранние исследования воды в биологических системах были скорее выполнены на количественной основе, чем на качественной. Некоторые эксперименты были основаны на измерении различий массы влажных и высушенных тканей растений и животных. Высушивание, или мумификация, человеческого тела указывало на важность воды для человека.

В семнадцатом и восемнадцатом столетиях, когда химия еще формировалась как наука, теорию осмотической регуляции уже начали применять по отношению к живым клеткам. Однако решающий толчок развития исследований по выяснению роли воды в биологии произошел в двадцатом столетии после основополагающих для теории разбавленных растворов работ химиков Вант-Гоффа и Аррениуса. Основываясь на теориях Вант-Гоффа и Аррениуса, биологи De Vries и Pfeffer сформулировали некоторые научные положения электрофизиологии, актуальные и в настоящее время (Hodgkin, Huxley, 1939). Применив теорию осмотической регуляции к живым клеткам в 1950-х годах, Ponder, Lucke и Dick получили первичные результаты о состоянии воды в клетках. Оказалось, что клетки не ведут себя как истинный осмометр.

Мембранная теория функционирования клеток возникла из теории разбавленных растворов и основана на химических и физических свойствах клеточных мембран, обусловливающих способность создавать асимметрическое распределение ионов между внутренней и внешней поверхностью клеток. Эта теория опирается на существование мембранных ферментативных насосов, которые с помощью энергетически зависимых процессов перемещают ионы как Na, так и K, но не предусматривает каких-либо изменений физических свойств воды в течение клеточного цикла или трансформации.

Противоположная гипотеза, в соответствии с которой структура воды и белков протоплазмы играет важную роль в функционировании клетки (Ling, 1962; Troshin, 1965), названа адсорбционной теорией. Лучшее развитие этих представлений было сделано Ling в его ассоциативно-индукционной гипотезе, согласно которой ионы главным образом связываются с зарядами боковых групп клеточных макромолекул, а вода, взаимодействуя с клеточными макромолекулами, изменяет физические свойства. При такого рода взаимодействиях образуются специфические растворы цитоплазмы, в результате чего возникает асимметрическое распределение ионов Na и K в цитоплазме. Эта теория предсказывает изменения физических свойств воды в течение клеточного цикла и при трансформации, являющихся следствием изменений концентрации как электролитов, так и групп макромолекул, подвергающихся конформационным изменениям, а также изменений состава клеток. Данные, представленные в этой главе, направлены на поддержку представлений о клетке как о едином целом, в котором все компоненты взаимосвязаны посредством их влияния на структуру воды в клетке.

Ядерный магнитный резонанс, или ЯМР-спектроскопия,— метод, который был заимствован у физики и химии, позволяет изучать свойства воды нормальных и трансформированных клеток и тканей. Прежде чем рассматривать данные о трансформированном состоянии клеток, полученные с помощью этого метода, в следующем разделе будет представлено объяснение принципов, лежащих в его основе. Будет сделана попытка объяснить, как значения продолжительности времен релаксации T_1 и T_2 характеризуют состояние воды в клетках и скорость вращения ее молекул.

9.1.2. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Краткое обсуждение теории импульсного ЯМР можно найти в нескольких источниках, включая «Импульс и четвертое превращение ЯМР» Farrar и Becker (1971). В настоящее время используются два типа ЯМР — импульсный ЯМР и ЯМР с постоянной волновой энергией, наиболее часто использующийся в органической химии, хотя оба они основаны на одном и том же принципе.

Открытие ядерного магнитного резонанса принадлежит двум группам ученых: Block, Hansen, Packard из Стенфорта и Purcell, Torrey Pound из Гарварда. ЯМР основан на способности атомных ядер поглощать энергию, когда они размещены в магнитном поле при определенных резонансных условиях. Это — форма спектроскопии, и она может быть отнесена к большому семейству оптической спектроскопии, основанной на явлении поглощения или излучения электронами энергии, которое мы наблюдаем, используя методы калориметрии или спектрофотометрии. Если атомные ядра со спином I размещены в постоянном внешнем магнитном поле, они займут положение на $(2I + 1)$-энергетических уровнях. Для простейшего случая ядер водорода со спином $^1/_2$ имеются два возможных энергетических уровня, разность энергии которых $\Delta E = \mu H_0/I$, где μ — ядерный магнитный момент, а H_0 — значения постоянного магнитного поля. Значение μ определяется по формуле $\mu = \gamma h I/2\pi$, где γ — гиромагнитное отношение для изучаемых частиц, h — постоянная Планка. Следовательно, когда водосодержащие образцы ткани размещаются в магнитном поле, ядра атомов водорода распределяются по двум энергетическим уровням, один из которых будет параллелен магнитному полю, а другой антипараллелен направлению поля H_0. Ядра распределяются в магнитном поле между двумя энергетическими уровнями неравномерно: на нижнем энергетическом уровне их несколько больше. Поскольку каждая частица обладает зарядом и спином, общий суммарный магнитный момент образца в магнитном поле будет заметно увеличиваться и выражен как М, значение которого при этом стремится уравняться с полем H_0. Так как каждое ядро является вращающейся заряженной частицей, имеющей магнитный момент, наложение внешнего поля H_0 влияет на этот момент так, что частица начинает прецессировать или вращаться вокруг направления магнитного поля с частотой, которая определяется уравнением Лармура

$$w_0 = -\gamma H_0 \ (\text{рад} \cdot \text{с}^{-1}),$$

где w_0 — *резонансная частота* для *соответствующего типа ядер*. Это свойство системы — возмущаться при наложении магнитного поля — может быть использовано при ее исследовании. Для этого должна быть приложена энергия только той резонансной частоты, которая поглощается исследуемыми ядрами.

Если H_0 и w_0 — постоянные величины для данных ядер вещества (как, например, водород для воды), угол Θ, определяемый между магнитным моментом и H_0, может изменяться при изменении длитель-

ности импульса или времени подачи энергии в систему. Угол Θ может быть вычислен по следующему уравнению:

$$\Theta = \gamma H_1 t_w \text{ (радиан)},$$

где t_w — длительность (выраженная в мкс) *импульса* энергии радиочастоты (rf), вводимой в систему через медную катушку под прямым углом к H_0, приложенному к резонатору с образцом. Малое магнитное поле H_1 прилагается к H_0 под прямым углом к этой катушке.

Контролируя t_w и H_1, можно формировать импульс энергии, который будет вращать вектор намагниченности (M) системы от 90 до 180° относительно направления H_0 (так называемые импульсы 90 и 180°). В импульсном ЯМР спектрометре радиочастотный импульс передается образцу посредством катушки, а когда эта передача энергии оканчивается, то катушка работает как приемник энергии, регистрирующий возвращение энергии M_0 системы в состояние равновесия. После приложения импульса энергии M_0 в z-направлении будет наблюдаться вращение в x — y-плоскости и прецессия относительно H_0, индуцирующая ток в катушке. Этот индуцированный сигнал будет затухать с постоянной времени T_2, называемой временем спин-спиновой релаксации.

Экспериментально определяемое T_2^* системы короче, чем расчетное теоретическое, что обусловлено неоднородностью поля, взаимодействием спинов соседних атомов водорода, быстрой утратой фаз резонансной частоты (Лармура) исследуемых ядер

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta H_0}{2}.$$

Если после промежутка времени τ к системе под углом 180° приложить импульс энергии, то порядок спинов в плоскости x — y будет обратным — спины поменяют фазы, а через 2τ в катушке будет индуцировано спин-эхо. Использование этой методики идеально устраняет укорочение T_2, обусловленное только спин-спиновым обменом между ядрами водорода в системе в процессе возвращения ее к равновесию. Скорость, с которой M_0 устанавливается вдоль оси z после воздействия импульса энергии под углом 180°, определяется с помощью T_1, времени спин-решеточной релаксации, т. е. времени, необходимого для установления теплового равновесия между магнитными ядрами и окружающими атомами и молекулами. А вращение системы, вызванное импульсом энергии под углом 180° в интервале времени τ, позволяет импульсу энергии под углом в 90° переориентировать M_z компонент в x — y плоскости и индуцировать сигнал в катушке. Затухание амплитуды эха на оси z происходит в связи с тепловым обменом ядра и окружающей решетки других молекул через все степени свободы, исключая спин.

Bloch и соавторы (1946) предложили уравнение для определения только течения намагничивания системы M_0, когда она выводится из состояния равновесия импульсом, включающим влияния радиочастотного поля и предполагаемых T_1 и T_2, являющихся процессами первого порядка. Временная зависимость может быть выражена

вектором каждого компонента:

$$dM_x/dt = \gamma(M_yH_0 + M_zH_1 \sin wt) - M_x/T_2;$$
$$dM_y/dt = \gamma(M_zH_1 \cos wt - M_xH_0) - M_y/T_2;$$
$$dM_zP/dt = -\gamma(M_xH_1 \sin wt + M_yH_1 \cos wt) - (M_z - M_0)/T_1,$$

где T_1 и T_2 соответственно время спин-решеточной и спин-спиновой релаксации системы; T_1 — постоянная времени, необходимого для восстановления равновесия энергии M_0 вдоль оси z, а T_2 — постоянная времени, необходимого для восстановления ее равновесия в плоскости $x - y$.

В экспериментах, представленных в этой главе, T_1 определялось путем последовательного введения импульсов энергии под углом 180°, а через промежуток времени τ — под углом 90°. Импульс 180° возмущал эхо M_0, которое затухало от $-M_0$ через 0 обратно к его уравновешиванию с M_0 снова. Рост кривой M_z определяется промежутком времени τ между импульсами 180° и 90°, который вызывает вращение оставшейся энергии M_z в плоскости $x - y$, где она может быть обнаружена. После каждого 90°-ного импульса перед следующим 180°-ным система должна получить возможность вернуться в состояние равновесия, что происходит, по крайней мере, через $5T_1$. Используя различные промежутки времени, можно следить за экспоненциальным увеличением M_0, как это вытекает из уравнения Bloch

$$M_z = M_0[1 - 2\exp(-\tau/T_1)].$$

В этих экспериментах амплитуда свободного затухания h_t, последовавшего после 90°-ного импульса, откладывалась на графиках против τ и по наклону линии, определяющей взаимоотношения этих величин, вычислялось

$$T_1 = \frac{1}{\text{наклон } \ln(1 - h_t/h_0) \text{ против } \tau},$$

где h_0 — предельное значение амплитуды, полученное для $\tau > 5\,T_1$. T_2 измерялось методом Carr — Purcell (1954) в модификации Мейбум — Гилла (Meiboom et al., 1957). Последовательности Carr — Purcell заключались в том, что за импульсом под углом 90° следовала серия импульсов под углом 180° через равные промежутки времени (т. е. 90° — τ — 180° — 2τ — 180° ...). Модификация такой последовательности заключалась в смещении на 90° фазы для 180° по отношению к 90°-ному импульсу. Это компенсировало неточности в подаче импульса с t_w, обусловленные негомогенностью поля. Такая последовательность импульсов вызывала серию снижающихся, свободно затухающих спиновых эхо-импульсов, следующих после 90°-ного импульса с интервалом в 2τ. Амплитуда каждого последующего эха зависит от времени релаксации T_2, как это вытекает из уравнения Bloch в модификации Carr и Purcell (1954)

$$h_t = h_0 \exp(-t/T_2) - \frac{D\gamma^2G^2\tau^2t}{3},$$

где G — градиент магнитного поля, а D — половина диффузионного коэффициента воды. Если градиент поля небольшой, а τ — достаточ-

но короткое, то величиной диффузии можно пренебречь и определить T_2 по наклону линии графика, отражающего изменение $\ln(h_t/h_0)$, зависимое от t:

$$T_2 = \frac{1}{\text{наклон } \ln(h_t/h_0) \text{ против } t}.$$

Если градиент поля G известен, можно определить D.

Значения T_1 и T_2 для чистой воды при 25 °C порядка 3000 и 2700 мс соответственно. В исследованиях биологических систем обнаружено укорочение T_1 воды до 100—1 000 мс, а T_2 — еще более короткое (10—200 мс). Существует много предположений, объясняющих такое сокращение времени релаксации, которые в целом сводятся к тому, что такое укорочение в живых системах показывает снижение свободы движения, по крайней мере, некоторой части молекул воды в клетке. Снижение значений T_1 и T_2 означает уменьшение скорости движения усредненной молекулы воды в системе. Так, значения времени релаксации воды показали сложность эффектов, которые появляются во всех других компонентах живых систем. Свойства воды стали макроскопическим отражением множества тонких изменений клеточной физиологии. Вода —зонд, который может быть использован для обогащения наших знаний о трансформированных и нормальных клетках. Изменения свойства воды отражают существенные изменения молекулярной структуры мембран, цитоскелета и клеточных органелл. Таким образом, состояние воды является интегральным показателем тонких механизмов трансформации клеток, который легко можно определять по параметрам ЯМР.

9.1.3. Определение различий свойств воды в нормальных и трансформированных тканях

Давно было установлено, что содержание воды в опухолях выше, чем в тканях организма-хозяина. Еще в 1916 г. Cramer (1916) представил данные, согласно которым процентное содержание воды в опухолях было связано со скоростью их роста — быстрорастущие опухоли имели более высокое содержание воды. McEwen и Haven (1941) затем установили, что такого рода изменения не были обусловлены потерей сухих веществ клеток, а являются следствием поглощения воды трансформированными клетками. Schlottman и Rubenow (1932) обнаружили, что повышение содержания воды происходит не только в опухолях, а и в отдаленных тканях организма, что говорит о системном эффекте. Эти результаты, полученные в ранних работах, свидетельствуют о связи содержания воды в тканях и способности их к росту, а в некоторых случаях о прямой связи свойств воды и опухолевого процесса. В 1950 г., используя многолучевой интерференционный микроскоп, Mellors и сотрудники (1953) обнаружили, что отдельные клетки саркомы содержат больше воды, чем нормальные фибробласты. Downing и сотрудники (1962), также используя интерферометрию для исследования гидратации нормальных и опухолевых клеток, установили, что увеличение содержания воды в опухоли

Таблица 1. **Время релаксации протонов воды нормальных и опухолевых тканей**

Ткани	Время спин-решеточной релаксации, T_1 (мс)		Источник
	Нормальные	Опухолевые	
Человек (24 MHz)			
легкие	788	1110	Damadian et al. (1973)
молочная железа	367	1080	
кожа	616	1047	
желудок	765	1238	
тонкий кишечник	641	1122	
мышца	1023	1413	
мочевой пузырь	891	1245	
кость	554	1027	
печень	570	832	
селезенка	701	1113	
яичник	989	1282	
щитовидная железа	882	1072	
Человек (30 MHz)			
молочная железа	682	874	Medina et al. (1975)
Мышь (100 MHz)			
мышца	850	880	Iijima et al. (1973)
печень	420	480	
мозг	840	930	
Человек (25 MHz)			
молочная железа	415	819	Kasturi et al. (1976)
желудок	841	997	
шейка матки	825	1089	
кожа	360	1037	
Мышь			
мышца	471	662	Hollis et al. (1973)
печень	263	798	
Человек			
почки	459	638	Hollis et al. (1973)
толстый кишечник	475	553	

связано с ее накоплением внутри клеток. Полученные результаты показали важное значение накопления воды для раковых клеток, но определить общетеоретическую роль этого фактора в опухолевом процессе стало возможным с применением количественных методов измерения.

Такого рода исследования были невозможны до появления спектроскопии ядерного магнитного резонанса, с помощью которой биологи и физики могут исследовать состояние воды в раковых клетках. Она позволяет изучать ядра водорода воды тканей в живых клетках без их разрушения.

В 1956 г. Odeblad и сотрудники (1956) первыми обнаружили связанную с водой четкую полосу поглощения ЯМР в живых клетках. Они установили, что обмен обычной воды на тяжелую воду в эритроцитах приводит к изменениям сигнала ЯМР, таким образом, показав, что с помощью этого метода можно изучать различные состояния воды в клетках.

В 1960 г. ученые продолжили исследования по выяснению роли воды в биологических системах. В 1965 г. Odeblad и Ingelman — Sundberg

(1966) использовали ЯМР для изучения состояния воды в клетках гладкой мышцы матки и обнаружили влияние гормонов на состояние воды в этих клетках.

Swift и Fritz (1969) исследовали состояние воды в мышце лягушки методом ЯМР и обратили внимание на уменьшение свободы движения воды. Cope (1969) и Hazlewood с сотрудниками (1972) обнаружили в ткани поперечнополосатых мышц крыс методом ЯМР минимум две фракции воды. Damadian (1971) был первым исследователем, который показал с помощью ЯМР, что время релаксации протонов воды в тканях саркомы и гепатомы Новикова были значительно выше, чем в нормальных гомологичных тканях крыс. Результаты Дамедяна были подтверждены Hazlewood и сотрудниками (1972, 1974), которые получили сходные данные для различных тканей млекопитающих. Быстро появились другие статьи (Hazlewood et al., 1972; Damadian et al., 1973; Inch et al., 1974; Hollis et al., 1973, 1974; Sarayan et al., 1974; Iijima, Fujii, 1972; Iijima et al., 1973). Данные этих многочисленных литературных источников, которые подтверждают различия спин-спинового и спин-решеточного времени релаксации для воды в нормальных и трансформированных тканях, представлены в табл. 1. В общем, хотя и не во всех случаях, в тканях опухолей значения T_1 и T_2 были больше, чем в гомологичных нормальных тканях. Это было началом исследования возможностей использования ЯМР для диагностики рака.

9.1.4. Возможность использования ЯМР для изучения трансформации

Использование спектроскопии ЯМР для изучения содержания воды и ее свойств в тканях без их разрушения станет мощным инструментом в руках исследователей трансформации нормальных клеток в опухолевые. Изменение содержания и подвижности воды в тканях может быть изучено на протяжении всего спектра различных типов злокачественных опухолей у всех видов животных. Можно определить общие с нормальным состоянием характеристики и отличные от него, а также момент появления этих признаков по мере развития предопухолевого состояния ткани и последующего превращения ее в опухолевую.

Современные установки ЯМР позволяют обнаружить и регистрировать изменения этих показателей в тканях, исследуя полностью тело человека и получая его отражение. Путем фокусирования только небольшого пятна магнитного поля при необходимой для исследования водорода воды соответствующей силе поля и резонансных условий можно сканировать точка за точкой все человеческое тело, выявляя в органах области с более высокими значениями, чем в норме, времени релаксации T_1T_2. Такие ЯМР-отражения человеческого тела были выполнены Damadian и сотрудниками (1977). Много работы еще предстоит сделать прежде, чем эти данные можно будет точно интерпретировать и будут ясны молекулярные механизмы выявленных изменений. Тем не менее метод ЯМР предоставляет возможность

изучать развитие рака в организме без нарушения его функций и разрушения тканей не только путем изучения свойств воды, но также путем использования других стабильных ядер, таких, как углерод-13, кислород-17, фосфор-31, которые участвуют в метаболизме трансформированных клеток.

9.2. «СИСТЕМНОЕ ВЛИЯНИЕ» ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК НА СВОЙСТВА ВОДЫ В ДРУГИХ ТКАНЯХ И СЫВОРОТКЕ

Использование метода ЯМР в исследовании трансформированного состояния клеток привело к интересным побочным результатам. Так как появление опухоли приводит к физиологическим изменениям в тканях организма, то не было неожиданностью, что ЯМР-свойства и содержание воды в тканях органов, удаленных от опухоли и сыворотки животных-опухоленосителей, также будут изменены. В последующих разделах будет дан современный обзор ЯМР-исследований так называемого «системного влияния» и представлены экспериментальные результаты, подтверждающие этот феномен у животных и человека.

9.2.1. Не пораженные опухолью органы животных-опухоленосителей

В первых исследованиях опухолей с помощью ЯМР Frey и сотрудники (1972) обнаружили, что в тканях некоторых органов животных-опухоленосителей повышено время спин-решеточной релаксации T_1 протонов воды по сравнению с тканями этих органов животных без опухолей. Несколько типов опухолей было перевито в мышцы задней лапки мышей C3H/HeJ. Опухоли росли 6—10 дней до пальпируемых размеров, после чего с помощью метода ЯМР исследовали ткани организма. Результаты этих и других исследований представлены в табл. 2. Они подтверждают результаты тех работ, в которых авторы пришли к выводу о существовании «системного влияния» на ткани организма перевиваемых опухолей (см. табл. 2). В этих работах установлено, что, во-первых, длительность T_1 протонов воды в опухолях больше, чем в гомологичных нормальных тканях интактных животных; во-вторых, в тканях животных-опухоленосителей значения T_1 выше, чем у контрольных животных; в-третьих, инфекционные заболевания и болевой стресс не вызывают подобных изменений в тканях животных.

Frey и сотрудники (1972) пришли к заключению, что повышение значений T_1 в органах, удаленных от опухолей, позволяет полагать, что в течение роста новообразования некоторые вещества или биологические интермедианты проникают в кровяное русло, вызывая прямое или опосредованное влияние на ткани организма, которое приводит к изменениям структуры воды. Распределение этих интермедиантов по их действию на увеличение значений T_1 может оказаться полезным диагностическим инструментом. Результаты работы Frey

Таблица 2. **Увеличение времени спин-решеточной релаксации (T_1) в тканях животных с различными опухолями**

Животное, вид опухоли	Ткань	T_1 (мс) Интактные животные	T_1 (мс) Животные с опухолями	Литературный источник
Мышь, опухоль MCl (T_1 = 853 мс ± 19 мс)	Сердце	650±6	705±5	Frey et al. (1972)
	Головной мозг	646±4	618±41	
	Легкие	641±9	665±47	
	Мышцы	615±10	643±10	
	Селезенка	571±8	731±8	
	Почки	470±6	601±19	
	Печень	386±13	461±9	
	Кожа	390±39	442±37	
	Кишечник	366±19	399±24	
	Желудок	294±23	317±29	
Мышь, опухоль MH134 (T_1 = 1000 мс)	Мышцы	850	880	Iijima et al. (1973)
	Печень	420	480	
	Головной мозг	840	930	
Мышь, фибросаркома	Печень	243—262	293—357	Economou et al. (1974)
	Почки	272—307	337—422	
	Митохондрии печени	354	701	
Крыса, аденокарцинома 4658 (T_1 = 1113 мс)	Печень	467±26	628	Bovee et al. (1974)
	Мышцы	850±29	894	
Крыса, рабдомиосаркома R_1 (T_1 = 1150 мс)	Печень	467±26	556	
	Мышцы	850±29	882	
	Почки	668±31	811	
	Селезенка	582±18	686	
Крыса, ретикулярная саркома 2880 (T_1 = 1138 мс)	Печень	467±26	652	
	Мышцы	850±29	921	
Крыса, аденокарцинома 3207 (T_1 = 1279 мс)	Печень	467±26	528	
	Мышцы	850±29	903	
Мышь, карцинома молочной железы С3Н	Печень	341±5	335±28	Inch et al. (1974)
	Селезенка	523±7	492±27	
	Почки	452±5	463±19	
	Мышцы	590±8	599±25	
Мышь, С3Н (T_1 = 887 мс ± ± 4 мс)	Печень	438±36	468±35	Hazlewood et al. (1974)
	Селезенка	737±6	734±12	
	Почки	503±11	577±14	
Мышь, С3Н (T_1 = 90 мс ± ± 43 мс)	Печень	412±12	374±25	
	Селезенка	671±9	716±7	
	Почки	551±9	537±17	
Мышь, гомотрансплантанты С3Н	Печень	341±5	347±7	Inch et al. (1974)
	Селезенка	523±7	551±24	
	Почки	452±5	448±10	
	Мышцы	590±8	586±7	
Мыши (лимфосаркома 6CHED) (T_1=674 мс ± 10 мс)	Печень	225±5	283±8	Hollis et al. (1974)
	Почки	322±11	365±23	
	Мышцы	465±49	458±51	

Продолжение табл. 2.

Животные	Ткань	Нормальные	Опухоленосители	Ссылка
Мыши (асцитная карцинома Эрлиха)	Гомогенат печени			Floyd et al. (1974)
	1-й день	700	820	
	2-й день	800	830	
	3-й день	750	790	
	4-й день			
	5-й день	500	720	
	Кровь			
	1-й день	1380	1580	
	2-й день	1380	1380	
	3-й день	1380	1580	
	4-й день	1380	1580	
	5-й день	1380	1610	

Животные	Орган	Разница между значениями T_1 тканей органов интактных животных и опухоленосителей через 46 сут	Ссылка
Крысы (гепатома Морриса, привитая в лапу)	Печень	До 120 мс	Hollis et al. (1974)
	Почки	До 74 мс	
	Селезенка	До 140 мс	
	Сердце	Без изменений	
	Скелетные мышцы	То же	

(1972) были впоследствии подтверждены во многих лабораториях, о чем свидетельствует табл. 2, в которой суммированы эти данные.

Hollis и сотрудники (1974) провели исследование изменений значений T_1 в тканях крыс после перевивки им в заднюю конечность клеток гепатомы Морриса 3924А. Повышение значений T_1 наблюдалось в течение роста опухоли в тканях печени, селезенки и почек, тогда как в скелетных мышцах и сердце таких изменений не наблюдалось. В этой же статье указывается на увеличение значений T_1 в ткани печени и почек мышей с лимфосаркомой (6C3HED). Последующие попытки выяснить механизмы системного эффекта сделаны Floyd и сотрудниками (1975). Эксперименты были выполнены на двух группах крыс, в одной из которых животные получали на протяжении 4 недель быстродействующий канцероген 3′-МеДАБ, а в другой — медленнодействующий канцероген ацетиламинофлюорен (ААФ). Быстродействующий канцероген 3′-МеДАБ вызывал увеличение значений T_1 в печени, когда в этом органе появились предопухолевые узелки. В печени животных другой группы таких изменений не наблюдалось. Изменение значений T_1 в ткани селезенки коррелировало с уровнем содержания железа в этом органе (Floyd et al., 1975; Block, 1973; Dodd, 1975).

На основании таких исследований можно прийти к некоторым выводам о механизмах «системного действия» опухоли на ткани организма, а именно: при развитии всех изученных типов экспериментальных опухолей у животных, по крайней мере в ткани одного органа, а иногда во многих органах происходит повышение значения T_1; значения T_2 повышаются в тканях животных-опухоленосителей только от случая к случаю; размер эффекта различается в зависимости от типа опухоли и вида животных (Ratkovic, Rusov, 1974).

9.2.2. Сыворотка животных-опухоленосителей

В то время как был установлен феномен повышения значений T_1 в тканях органов организма-опухоленосителя, Floyd и сотрудники (1974) обнаружили аналогичное явление в сыворотке крови. Предположение Frey и сотрудников (1972), что опухолевые клетки могут секретировать в кровь некоторые вещества, которые переносятся в различные органы организма, удаленные от опухоли, и вызывают повышение значений T_1, подтверждено Economou и сотрудниками (1973). Они также представили результаты, согласно которым значение T_1 может увеличиваться в сыворотке крови людей, больных раком. Floyd и сотрудники (1974) внутрибрюшинно перевивали мышам живые и мертвые клетки асцитного рака Эрлиха — Леттре. Через сутки после введения клеток значение T_1 плазмы мышей увеличивалось на 14—19 %, на 2-е сут опухолевого роста оно понижалось почти до нормы, затем снова (на 5-е сут) повышалось до уровня, превышающего на 6—8 % нормальные значения (см. табл. 3).

В том же самом году Hollins и сотрудники (1974) изучили изменения значений величины T_1 в сыворотке крови крыс, которым была перевита в нижнюю конечность гепатома Морриса. С первых по 46-е сутки эксперимента в сыворотке крови этих крыс отмечалось повышение значений T_1 по сравнению с интактными животными. В терминальных стадиях значение T_1 было на 210 мс выше исходных контрольных данных. Спустя 8 сут после перевивки T_1 увеличилась пропорционально размерам опухоли (табл. 3).

Floyd и сотрудники (1975) вернулись к этой интересной проблеме, исследовав этот показатель у крыс, получавших быстро- и медленнодействующие гепатоканцерогены. Значение T_1 для сыворотки у животных, получавших быстродействующий канцероген (3′-Me-ДАБ), через 4 недели существенно повышалось, тогда как для сыворотки у животных, получавших медленнодействующий канцероген, ацетиламинофлюорен, таких изменений не наблюдалось (см. табл. 3). В нашей лаборатории были выполнены эксперименты на модели развития рака молочной железы у мышей с целью определения возможностей использования этого феномена для распознавания рака.

В первых исследованиях было изучено, как влияют доброкачественные и злокачественные опухоли на значение T_1 сыворотки крови. Так как Hazlewood и сотрудники (1972) с помощью метода ЯМР уже обнаружили различия нормальных, предопухолево измененных и раковых тканей молочной железы мышей (табл. 4), мы использова-

Таблица 3. **Повышение значения времени спин-решеточной релаксации (T_1) в сыворотке животных и человека с различными злокачественными новообразованиями**

Вид хозяина	Сыворотка T (мс)		Литературный источник
	Нормальные	Животные-опухоносители	
Человек			
(лейкемия—обострение)	1230±170 ($n = 7$)	—	Ekstrand et al. (1977)
	[1260±60 ($n = 7$)][1]	[1105±100 ($n = 10$)][a]	
(лейкемия—ремиссия)	1230±170 ($n = 7$)	1170±100	
(карцинома шейки матки)	1230±170	1230±90 ($n = 15$)	
(карцинома молочной железы)	1230±170	1260±80	
Мыши (асцит Эрлиха) (плазма крови)			Floyd et al. (1974)
1-й день	1370	1580	
2-й »	1370	1380	
3-й »	1370	1580	
4-й »	1370	1580	
5-й »	1370	1610	

Животные	T_1 (мс) = T_1 (оп.) — T_1 (контр.)	Литературный источник
Крысы (гепатома Морриса)		Hollis et al. (1974)
День 5-й	45	
8-й	0	
12-й	55	
15-й	60	
20-й	55	
21-й	75	
28-й	100	
40-й	160	
46-й	210	

Животные	Контроль T_1 (мс)	Получавшие ацетиламинофлюорен. T_1 (мс)	Литературный источник
Крысы			
Неделя 1	750	770	Floyd et al. (1975)
2	740	780	
4	700	810	
4	770	780	

[1] — значения в квадратных скобках даны для плазмы.

Таблица 4. **Значение времени спин-решеточной релаксации протонов воды в сыворотке нормальных и больных раком молочной железы мышей**

Группа	n^1	Время спин-решеточной релаксации в сыворотке T_1 (среднее значение ± ± стандартное отклонение ± стандартная ошибка), мс	Содержание в сыворотке		Степень достоверности различий по отношению к норме для T_1, p^2
			железа, мг %	белка, мг %	
Нормальная железа нерожавших самок	24	1554±93±19	229	4,95	
Гиперплазия эпителия протоков молочной железы (CDH1)	4	1575±44±22	—	—	> 0,5
Папиллома протоков	4	1719±44±22	—	—	< 0,005
Предопухолевые альвеолярные узлы (C4)	14	1564±48±13	210	5,60	> 0,5
Карцинома молочной железы	17	1801±189±46	229	5,60	< 0,001
Нормальная железа мышей, получавших безбелковую диету	5	1565±13±6	214	3,80	> 0,5

Примечания: n^1 — число животных и индивидуальных образцов; p^2 — вычислено по методу Стьюдента.

ли эту отличную модель для определения влияния опухоли и предопухолевого состояния ткани на значения T_1 сыворотки. Также было изучено влияние роста доброкачественной папилломы протоков, возникающей вследствие гиперплазии эпителия протоков молочной железы. Для того чтобы лучше понять механизм повышения значения T_1 в сыворотке, учитывалось влияние стресса, уровня железа и концентрации белка в сыворотке крови этих животных. В такого рода экспериментах было обнаружено, что увеличение значения T_1 регистрируется в сыворотке животных на ранних стадиях развития доброкачественных и злокачественных опухолей. Однако этого не происходит в предопухолевый период при гиперплазии эпителия протоков молочных желез. Повышение значения T_1 в сыворотке крови не коррелирует с силой стресса, уровнем железа или концентраций белка в сыворотке крови (см. табл. 4).

Сыворотку собирали индивидуально. Образцы брали у 24 нерожавших мышей и определяли в них среднее время спин-решеточной релаксации протонов воды T_1, которое составляло 1554 ± 93 мс. Низкое стандартное отклонение говорит о хорошей воспроизводимости значений времени спин-решеточной релаксации в сыворотке нормальных мышей. В сыворотке животных, которым были перевиты клетки папиллярной гиперплазии протоков и предопухолевые альвеолярные узлы, значение этого показателя не отличалось от значения у нормальных мышей (см. табл. 4). Сыворотка мышей с раз-

вивающейся доброкачественной опухолью, папилломой протоков молочной железы ($T_1 = 1917 \pm 44$ мс) или со злокачественной аденокарциномой молочной железы ($T_1 = 1801 \pm 189$ мс) четко отличалась по этому показателю от контрольных мышей. Не было обнаружено существенных различий содержания в сыворотке нормальных животных и опухоленосителей как по данным измерения наших образцов, так и по данным литературы (Beall et al., 1977; Saprin et al., 1976).

Проведены сравнительные исследования общего содержания белка (среднее значение четырех отдельных определений) сыворотки животных с предопухолевыми изменениями и раком молочной железы. Не были обнаружены такие различия, которые могли бы объяснить повышение T_1. Фактически, по данным Hollis и сотрудников (1974), незначительное увеличение концентрации белка приводит к удлинению T_1. Данные о том, что почти одни и те же значения концентрации белка в сыворотке крови обнаружены у мышей с двумя типами предопухолевых узлов и у животных с двумя типами злокачественных опухолей, ставят вообще под вопрос роль этого фактора в повышении значений T_1. Для того чтобы снизить концентрацию белка в сыворотке крови, животные были посажены на безбелковую диету. Сыворотка этих мышей, получавших в течение 5 дней глюкозу, имела низкую концентрацию белка (3,8 мг %), тогда как у контрольных животных содержание белка было 4,95 мг%. Однако значения T_1 сыворотки этих животных не отличались от контрольных. Следовательно, полученные результаты не подтверждают идею о том, что значения T_1 сыворотки являются только функцией концентрации белка и воды.

9.2.3. Заключение

Таким образом, по данным, полученным сотрудниками нашей лаборатории и другими исследователями, развитие как доброкачественных, так и злокачественных опухолей вызывает повышение значений T_1 в сыворотке крови и других тканях организма. Злокачественные новообразования вызывают более значительное повышение T_1 сыворотки, тогда как предопухолевое состояние или другие заболевания не влияют на этот показатель (см. табл. 3 и 4).

Исследования «системного влияния» опухоли, представленные в этой главе, являются примером, как изучение свойств воды может привести к новым путям определения наличия в организме трансформированных клеток.

9.3. ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ ВОДЫ В НОРМАЛЬНЫХ, ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ, ОБНАРУЖЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ЯМР

После первоначального открытия Демидяном (1971) того факта, что время релаксации ЯМР привитых опухолей отличается от их исходных нормальных тканей, многие авторы начали исследовать нормальные и опухолевые клетки.

9.3.1. Предопухолевые и опухолевые ткани молочных желез мышей

Предыдущие ЯМР-исследования рака были выполнены на перевивных опухолях давно установившихся клеточных линий. Однако существовало сомнение, можно ли эти результаты связывать с ранними стадиями спонтанно возникающего опухолевого процесса. Такого рода эксперименты были проведены в нашей лаборатории на модели первичной аденокарциномы молочной железы мышей (Hazlewood et al., 1972).

Нормальную ткань молочной железы брали на 17—19-й день беременности мышей BALB/c и CH3f. Ткань предопухолевых узлов, которые возникли после перевивки клеток линий D_1 и D_2, брали у мышей BALB/c, а также у мышей C3Hf, которым были привиты клетки узлов этих мышей, растущие вне организма. Предварительно была определена способность клеток этих линий вызывать опухоли. Клетки линии D_1 вызывали 2 % опухолей через 360 дней, тогда как клетки линии D_2 за этот же период времени — 45 % опухолей. По морфологическим признакам ткань узлов подобна ткани нормальной молочной железы во второй половине беременности мышей. Опухоли молочных желез брали после образования у мышей, которым были привиты указанные клеточные линии первичных опухолей (Medina et al., 1976a, b).

В первой серии экспериментов клетки узлов, растущих вне организма, были перевиты в молочные железы 3-недельных самок мышей BALB/c стандартным методом Medina и De-Ome (1970). Через 12—16 нед. их исследовали с помощью метода ЯМР.

Во второй серии экспериментов опухоли молочных желез C3H- и C3Hf-мышей были перевиты подкожно посредством троакара 13-го размера 4-месячным сингенным самкам мышей около правой лопатки. Опухоли C3H — трансплантаты второй генерации после перевивки клеток спонтанных новообразований, возникающих у мышей линии C3H. Опухоли C3Hf — трансплантаты второй и третьей генераций, которые вырастали после перевивки клеток узлов линии F_2 мышам C3Hf. Все опухоли исследовали через 1 мес после перевивки. Когда диаметр их достигал 10 мм, их удаляли хирургическим путем. После тщательного удаления участков некроза проводили исследования с помощью метода ЯМР, а также определяли содержание воды в ткани.

Результаты наших измерений параметров T_1, T_2 и D протонов воды в нормальной ткани молочной железы, предопухолевых узлах и ткани опухолей суммированы в табл. 5. Показатели времени релаксации и коэффициента диффузии протонов воды в этих тканях значительно ниже, чем в чистой воде. Это согласуется с представлениями, согласно которым на молекулы воды в живых тканях оказывает сильное влияние взаимодействие системы: вода — ионы — макромолекулы. В табл. 5 также показано, что три морфологические стадии (норма, предопухолевое состояние и опухоль) малигнизации ткани молочной железы могут быть обнаружены по значениям физи-

Таблица 5. **Значения времени релаксации воды тканей молочной железы мышей**

Молочная железа мышей	n^1	Время спин-решеточной релаксации T_1, мс	Время спин-спиновой релаксации T_2, мс	H_2O, %
Нормальные нерожавшие мыши	22	275±46	84±8	26,8±8,4
Нормальные беременные мыши	5	380±41		
Нормальные беременные мыши	8	357±47	47,1±9	34,0±1,9
Гиперплазия альвеолярных узлов (HAN)				
D_1	5	657±68	54,7±1,8	58,5±1,1
D_2	4	709±29	54,1±1,2	
D_2	5	451±21		
CD-3	17	350±75	85±18	31,10±13,1
Опухоли				
D_2	5	920±47	91±8	
C3H	7	887±40	78,8±8,2	83,1±1,0
C3Hf	12	906±43	80,3±5,9	84,0±0,3
CD-3	19	721±98	98±20	74,6±11,7

Примечание: n^1 — число образцов.

ческих параметров T_1 и T_2. Более того, следует отметить прогрессивное увеличение значений этих параметров по мере развития опухолевого процесса в молочной железе. Значения времен релаксации в опухолях почти в два раза превышают таковые в ткани молочной железы беременных животных и в ткани узлов. Значения этого показателя для ткани узлов (предопухолевое состояние) также несколько повышены по сравнению с тканью молочной железы беременных животных. Тенденция изменений коэффициента диффузии такая же, как и показателей времен релаксации. Так, значение D повышается в ткани опухолей молочной железы по сравнению с тканями узлов и нормальной молочной железы.

Полученные результаты показали возможность использования любого из трех параметров ЯМР для определения популяций с высоким риском развития опухолей, основанную на различиях показателей в тканях предопухолевых узлов и нормальных тканях молочной железы, хотя различий, по данным ЯМР, в двух линиях клеток, полученных из узлов молочных желез, не обнаружено.

Результаты, представленные в табл. 5, свидетельствуют о том, что опухоли молочных желез можно отличить от клеток узлов и нормальной молочной железы. Все три параметра монотонно увеличиваются по мере развития опухолей молочных желез мышей от нормальных клеток до стадии образования узлов и далее до появления опухолей. Эти данные подтверждают гипотезу, согласно которой HAN клетки представляют измененную популяцию клеток со свойствами, промежуточными между нормальными и опухолевыми клетками. Помимо этого, они дают теоретическое обоснование возмож-

ности использования ЯМР-спектроскопии в обнаружении подозреваемых клеточных популяций в молочной железе человека.

Параметры T_1 и T_2 протонов воды являются характеристикой конкретного состояния развития молочной железы. Это справедливо для большинства биологических и гормональных показателей, характеризующих предопухолевое состояние ткани и появление опухолей молочной железы. Так, изменения скорости роста и гормончувствительности количественно не коррелируют с возможностью образования опухолей клетками узлов, а связаны с состоянием развития популяций высокого риска, т. е. предопухолевых клеточных популяций HAN. Подобно этому изменения параметров T_1 и T_2 протонов воды связаны с предопухолевыми популяциями клеток HAN, но количественно не коррелируют с возможностью возникновения из них опухолей.

9.3.2. Нормальные, фиброзные, фиброкистозные, малигнизированные ткани молочных желез человека

Прежде всего рассмотрим результаты исследования параметров T_1 и T_2 протонов воды в тканях опухолей человека, полученные ранее Damadian и сотрудниками (1978), которые изучили 11 опухолей человека. Они показали, что T_1 и T_2 протонов воды в тканях опухолей могут отличаться от таковых нормальных тканей. Однако эти данные надо рассматривать с большой осторожностью, так как в работе проведено недостаточно контрольных исследований гомологичной нормальной ткани, а в некоторых случаях они вообще отсутствовали, число образцов, представляющих определенный тип опухоли, редко было больше одного. Кроме того, авторы измеряли только время спин-решеточной релаксации T_1. В противоположность этому в других работах Damadian и сотрудников (1973, 1974) представлены данные 106 исследований опухолей человека, среди которых меланомы, новообразования желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря, легких, эндокринных желез, лимфоузлов, костей, мышц, кожи, груди, печени. Ткани опухолей всегда отличались от нормальных значением T_1, а в некоторых случаях и T_2. Однако не исследовалось влияние на эти параметры тканевой патологии неопухолевого характера.

В экспериментах, представленных ниже (Medina et al., 1975), мы сконцентрировали внимание на способности с помощью ЯМР-спектроскопии различать нормальное и патологическое состояния ткани молочной железы, а также определять ее перерождение в опухолевую. Во всех образцах определяли как T_1, так и T_2. В отличие от других работ целью таких исследований было показать, существенно ли отличаются средние значения параметров T_1 и T_2 различных клеточных популяций, а если это так, то определить возможность использования индивидуальных образцов для определения различий между ними.

Все образцы ткани молочной железы человека были получены из больницы Святого Луки Техасского Медицинского центра в виде

свежего биопсийного материала, не подвергавшегося фиксации. Диагноз подтвержден с помощью гистологического исследования. Образцы для ЯМР подбирали с одинаковым содержанием жировой ткани и обычно анализировали через 1—4 ч после биопсии. Не было обнаружено какой-либо зависимости величин T_1 и T_2 от времени, протекающего с момента биопсии до измерения на ЯМР-спектрометре. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований. Сразу же после измерений на ЯМР образцы фиксировали в формалине и окрашивали гематоксилином или по Массону.

Гистологические исследования последних 30 образцов были выполнены как на тканях, из которых готовили образцы для ЯМР, так и на уже готовых образцах. Это было обусловлено гетерогенностью ткани молочной железы человека особенно при ее фиброкистозном перерождении. Фиброаденомы распознавались легко, тогда как фиброкистозное перерождение иногда определялось трудно. В наших исследованиях встречалось фиброкистозное перерождение, включая фиброз, апокринную метаплазию, расширение протоков или кист с различной степенью и вариабельностью гиперплазии эпителия протоков. Гиперплазия являлась наиболее важным признаком фиброкистозного перерождения.

Большинство карцином, обнаруженных в наших исследованиях, инфильтрировали протоки железы. При обработке результатов были использованы методы вариационной статистики — тесты Манна — Уайта (непараметрическая статистика), Стьюдента (различия между двумя значениями) и Бартлетта (X^2-критерий сравнения двух значений). Вероятность того, что данный образец относится к аденокарциноме или имеется фиброкистозное перерождение, определялась с помощью метода, детальное описание которого приведено ниже. В результате наших исследований оказалось, что значения T_1 и T_2 для аденокарцином молочной железы человека отличаются от таковых для тканей нормальной молочной железы и с фиброкистозным перерождением. Однако различия этих показателей для тканей аденокарциномы и фиброаденомы незначительны. Так, значения T_1 ($M \pm \pm m$, мс) для тканей нормальной молочной железы составляли $682 \pm \pm 32$, фиброкистозного перерождения — 665 ± 51, фиброаденомы — 980 ± 51 и аденокарциномы — 874 ± 28. Средние значения T_1 для ткани аденокарцином существенно отличались от таковых как для ткани нормальной молочной железы ($p < 0{,}001$), так и для ткани фиброкистозного перерождения ($p < 0{,}001$), но мало — для ткани фиброаденом ($0{,}5 < p < 0{,}10$). Эти данные подтверждаются при обработке результатов с использованием X^2 критерия Барлетта.

Значения T_2 ($M \pm m$, мс) для тканей нормальной молочной железы, фиброкистозного перерождения, фиброаденом и аденокарцином составляли $35{,}5 \pm 3{,}5$, $37{,}0 \pm 3{,}0$, $62{,}5 \pm 7{,}3$ и $68{,}6 \pm 2{,}3$ соответственно. Значения T_2 для ткани аденокарциномы статистически отличались от таковых как для ткани нормальной молочной железы ($p < 0{,}001$), так и для фиброкистозного перерождения ($p < 0{,}001$), но менее существенно — для ткани фиброаденом ($p > 0{,}3$). Обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента

и непараметрического U-критерия Манн — Уайта. Оба способа статистической обработки показали достоверность различий значений T_1 и T_2 в совокупности образцов фиброкистозной ткани и аденокарцином. Следует отметить, что разброс данных по величине T_2 при фиброкистозном перерождении ткани выше, чем при аденокарциномах. Полученные результаты хорошо согласуются с данными Goldsmith и сотрудников (1978), изучавших рак молочной железы у людей. С целью определения опухолей с большей точностью, чем только с помощью одного времени релаксации, Goldsmith объединил оба показателя T_1 и T_2 в один «показатель малигнизации».

Таким образом, метод ядерного магнитного резонанса можно использовать для выявления рака при массовых осмотрах людей, особенно если применять не разрушающий ткани ЯМР-сканнер, позволяющий исследовать все тело.

9.4. ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НОРМАЛЬНОЙ, ПРЕДОПУХОЛЕВОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШЕЙ, ОБНАРУЖЕННЫЕ ПО ВРЕМЕНИ РЕЛАКСАЦИИ ЯМР ВОДЫ

Как упоминалось в других разделах этой главы, время спин-решеточной релаксации T_1 и время спин-спиновой релаксации T_2 протонов воды нормальных тканей отличаются от таковых тканей опухолей многих животных и человека. Определить молекулярную основу этих различий в целых тканях сложно в связи с влиянием на эти показатели соединительной ткани, содержания крови и лимфы в сосудах, уровня воды и сигналов водорода из липидов жиров. Установить это влияние и определить, действительно ли различия времени релаксации связаны только с изменением уровня гидратации в клетке, можно только с помощью исследования первичных культур. Так как ранее мы установили, что на основании различий T_1 и T_2 можно определить нормальное и предопухолевое состояние ткани молочной железы мышей, а также появление опухолей, было решено проверить справедливость таких выводов на первичных культурах этих тканей. На обогащенных популяциях эпителиальных клеток без чужеродного материала можно провести более четкие сравнительные исследования, чем на целых тканях.

Различия значений времени релаксации протонов воды, зарегистрированные с помощью метода ЯМР в культурах эпителиальных клеток, полученных из нормальной ткани молочной железы, были более четкими ($p < 0{,}001$), чем в клетках ткани, находящейся в предопухолевом состоянии, и малигнизированной ткани.

Ткани молочной железы получали по ранее описанному методу от самок мышей линии BALB/c Crgl. Ткани брали в асептических условиях, 3—4 раза промывали в сбалансированном солевом растворе Дюльбекко, забуференном HEPES (DBSS) (pH 7,3), и разрезали на кусочки (1—2 мм^3). Кусочки инкубировали в растворе коллагеназы (тип III, Worthington Enzymes, Freehold, New Jersey). Как описано в работе Asch и Medina (1978), клетки отмывали, пересаживали (Fal-

con) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 92,5 % воздуха с 7,5 % CO_2 в модифицированной Дюльбекко среде Игла (DMEM), содержащей 13 % эмбриональной бычьей сыворотки (Reheis) и 5 мг/мл инсулина, D-валин в ней был заменен L-валином для подавления роста фибробластов (Gilbert, Migean, 1975). Через 5 сут клетки собирали для измерений их ЯМР. Приблизительно 90—95 % клеток по своим морфологическим характеристикам относились к эпителиальным (рисунок, см. вклейку). Клетки каждого типа первичных культур перевивали в жировую клетчатку молочной железы самки 3-недельных сингенных мышей, а затем через 8 нед. после гистологического исследования определяли нормальную, предопухолевую или опухолевую ткань в соответствии с их морфологией (White et al., 1978).

Три линии клеток опухолей молочной железы мышей (ESSD/BALB CL3, MTV-L/BALB DL2, DMBA/BALB CL2) представлены доктором Butel из отдела вирусологии Baylor College of Medicine. Происхождение и характеристики роста in vivo и in vitro этих линий детально описаны в работе Butel и сотрудников (1977). Клеточные линии росли в DMEM с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 15 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл и 100 ед/мл стрептомицина и пенициллина, при 37 °С и атмосфере, состоящей из 90 % воздуха и 10 % CO_2.

Первичные культуры и стабильные линии раковых клеток были закодированы и определены только на основании данных T_1 и T_2. Для этого клетки отделяли от поверхности пластиковых флаконов тефлоновым скреппером. Проверка на наличие повреждений в клетках проводилась с помощью их окрашивания трипановым синим и показала отсутствие каких-либо повреждений после этой процедуры. Суспензии клеток в DMEM центрифугировали в условиях комнатной температуры (25 °С) в течение 40 мин, при ускорении 1200 в ампулах для исследований ЯМР. Супернатант удаляли, а ампулу вытирали хлопковой тканью. Остаточный межклеточный объем составлял около 10 %. После измерения ЯМР клеточный осадок высушивали до постоянной массы при 105 °С для определения отношения массы H_2O к массе твердого вещества (или % H_2O). Закрытые клеточные осадки измеряли при 30 MHz и 25 °С на спектрометре ЯМР Bruker SXP. T_1 определяли из 180°-τ-90° импульсных последовательностей, а T_2 — методом спин-эха по Carr-Purcell с коррекцией фазы по Meiboom-Gill.

Результаты экспериментов, проведенных на тканях (Hazlewood et al., 1972), показали, что значения T_1 и T_2 отражают различное состояние молочной железы мышей (см. табл. 5). Более того, после удаления жира, соединительной ткани, сосудистых элементов и участков некроза, используя первичные культуры, удалось увеличить достоверность различий по этим показателям ЯМР ($p < 0,001$) нормальных, предопухолевых и опухолевых эпителиальных клеток молочной железы (см. рисунок). Как значения T_1, так и значения T_2 для опухолевых клеток существенно отличались от таковых нормальных ($p < 0,001$). Эти различия не могут рассматриваться как различия клеточной гидратации (см. табл. 6). Значение времени релаксации для клеток, взятых из ткани, находящейся в предопухолевом состоянии, занимает промежуточное положение между значениями этого

Таблица 6. **Ткани и первичные клеточные культуры молочной железы: время релаксации воды, измеренное с помощью ЯМР, в нормальных, предопухолевых и опухолевых клетках**

Образец	Целая ткань		Первичные клеточные культуры [1]		
	T_1 (мс) [2]	T_2 (мс)	T_1 (мс)	T_2 (мс)	H_2O (%)
Нормальная ткань молочной железы беременных мышей	380±41	39±2	916±24	158±6	90,8±0,4
Гиперпластические альвеолярные узлы (D2-HAN)	451±21	53±1	1029±24 ($p<0{,}005$)[в]	187±7 ($p<0{,}01$)	90,0±0,5 ($p>0{,}7$)
Аденокарцинома молочной железы (D2)	920±47	91±8	1155±42 ($p<0{,}001$)	206±8 ($p<0{,}001$)	91,4±0,2 ($p>0{,}3$)

Примечания: [1]n = 15 образцам каждого типа или всего 45 образцов; время релаксации и % H_2O показаны как средние значения ± стандартное отклонение; 3p — степень достоверности различий между нормальной тканью и изучаемой, которая определялась с помощью t-критерия Стьюдента.

показателя для нормальных и опухолевых клеток. В 45 исследованных индивидуальных образцах не было случая, чтобы значения T_1 опухолевых клеток и нормальных перекрывались, и только в пяти случаях такое наблюдалось в клетках, полученных из ткани молочной железы, находящейся в предопухолевом состоянии. Существенных различий гидратации нормальных и опухолевых ($p > 0{,}3$) или нормальных и предопухолевых клеток ($p > 0{,}7$) не наблюдалось.

Средние значения T_1 и T_2 для предопухолевых клеток в первичных культурах занимают промежуточное положение между таковыми для опухолевых и нормальных клеток. Значения T_1 для первичных культур, полученных из предопухолевых узлов и растущих 13—14 нед., были подобны таковым для первичных культур, полученных из 16—17-недельных трансплантатов узлов даже примерно через 19 нед., в период появления опухолей. Это может свидетельствовать о том, что в разные периоды роста ткань предопухолевых узлов (HAN) не постепенно перерождается в опухолевую, а резко, спонтанно. Для того чтобы эти исследования были более исчерпывающими, полученные для первичных клеточных культур данные сравнивали со значениями T_1 и T_2 для трех стабильных клеточных линий опухоли молочной железы мышей, которые серийно пассировали в культуре более чем три года (Butel et. al., 1977). Все три линии имели более низкие значения T_1, T_2 и процент H_2O, чем первичные культуры (табл. 7). Из полученных данных можно сделать два важных вывода. Во-первых, даже для стабильных клеточных линий, если отложить на графике $1/T_1$ против отношения массы воды к массе твердого вещества, мы не получим монотонной линии, свидетельствующей о наличии взаимоотношений этих показателей (которую

Таблица 7. **Время релаксации протонов воды, измеренное методом ЯМР в стабильных клеточных линиях молочной железы мышей**

Линия	n^1	$T_1 \pm$ SE (мс)^2	$T_2 \pm$ SE (мс)	H_2O (%)
ESD/BALB CL3	5	632±8	1138±8	85±0,7
MTV-L/BALB CL2	8	762±26	105±5	83,9±0,7
DMBA/BALB CL2	5	739±33	109±8	83,8±0,2

Примечания: n^1 — число образцов; (мс)^2 — время релаксации и % H_2O представлены как средние значения ± SE стандартное отклонение.

надо было бы ожидать, если бы различия значений показателей ЯМР были обусловлены только отличиями степени гидратации). Во-вторых, три стабильные линии отличались друг от друга, хотя все они были производными мышиной аденокарциномы молочной железы. В связи с этим не совсем корректно сравнивать стабильные опухолевые клеточные линии с нормальными первичными культурами, используя последние в качестве контроля. В случае таких экспериментов стабильные линии опухолевых клеток должны иметь значения T_1 и T_2 более низкие, чем «нормальные» клетки.

Некоторые авторы (Economou et al., 1973; Floyd et al., 1975; Hollis et al., 1973; Inch et al., 1974) полагают, что механизм, объясняющий увеличение значений T_1 и T_2 для воды раковых клеток,— повышение гидратации опухолевой ткани (по отношению к нормальной ткани). Так как в настоящее время существует множество статей, в которых показано, что T_1 в тканях животных и человека находится в прямой взаимосвязи с отношением массы воды к массе сухого остатка тканей (Ranade et al., 1976; Kasturi et al., 1976; Changhule et al., 1974a,b) и клеток (Beall et al., 1976a, b; Wagh et al., 1977), такое представление все еще часто используется для объяснения наблюдаемых в тканях опухолей фактов. Результаты настоящего исследования показывают, что различия значений T_1 и T_2 для нормальных, опухолевых и предопухолевых клеток имеются даже тогда, когда не существует различий их гидратации.

Трансформированные фибробласты, когда находятся в смешанной с нормальными клетками культуре, могут быть определены или отделены от находящихся рядом нетрансформированных фибробластов с помощью таких критериев, как размер или форма, окрашиваемость, утрата зависимого от плотности клеток торможения клеточного деления и перекрестного перемещения при образовании многослойных фокусов, пролиферация при низкой концентрации сыворотки, приобретение способности роста в полужидком агаре или метилцеллюлозе (Tooze, 1973). В противоположность этому поиск маркеров, с помощью которых можно идентифицировать или отобрать предопухолевые клетки в отдельности или вместе с опухолевыми эпителиальными клетками молочной железы из их нормальных двойников, оказался длительным, затрудняющим выполнение основной задачи. Как суммировано в табл. 6, не обнаружены различия, ко-

торые могли бы быть необходимыми для использования в определении ускорения или ингибирования роста или различий жизнеспособности одних типов клеток и популяций по сравнению с другими. Более того, большинство характеристик скорее относится к клеточным популяциям, чем к отдельным клеткам. В связи с тем что исследуемые показатели представляют средние значения популяции клеток, часто трудно точно интерпретировать полученную информацию, так как неизвестны количественные или качественные вариации, которые имеются в той или другой клетке. Например, как много клеток в популяции владеет определенными признаками? Какие качественные или количественные различия имеются среди клеток? Если не одинаково выражен конкретный признак во всех клетках популяции, что же определяет различия, которые мы установили? Эти проблемы особенно сложно решить при работе с молочной железой, так как ее ткань представляет гетерогенную популяцию эпителиальных клеток. Полностью дифференцированная молочная железа содержит помимо стромальных и сосудистых клеток, такие, как фибробласты, липоциты и эндотелиальные клетки, три типа эпителиальных: дуктальные, альвеолярные, миоэпителиальные. Установлено, что в HAN присутствуют альвеолярные и миоэпителиальные клетки, тогда как тип клеток, из которых впоследствии образуются опухоли и которые преобладают в них, не известен. Маркеры, которые позволяют идентифицировать три типа нормальных эпителиальных клеток молочной железы в различных условиях in vivo и in vitro, не способны определить роль и дальнейшую судьбу этих клеток в течение дисплазии и опухолеобразования в молочной железе.

Вопросы приведенной выше дискуссии необходимы для интерпретации данных ЯМР. Молекулярные механизмы различия значений ЯМР, полученных для культур нормальных, HAN и опухолевых клеток, не установлены. Более того, не известен вклад определенных субпопуляций клеток культуры, которые они вносят в эти изменения. Например, интересно было бы получить данные ЯМР для отдельных популяций альвеолярных, дуктальных и миоэпителиальных клеток, выделенных из тканей молочной железы, чтобы увидеть сходство или различие значений их показателей. Недавно была предложена методика (Kraehenbuhl, 1977) для разделения паренхимальных миоэпителиальных клеток, благодаря которой такие исследования скоро можно будет осуществить. Несмотря на эти ограничения, ЯМР-исследования дали принципиально новую информацию в этой области онкологии, что обеспечит основу для будущих работ. Во-первых, полученные результаты показали, что степень гидратации клеток примерно одинакова в культурах нормальных, предопухолевых и опухолевых клеток и этот параметр, следовательно, не является ответственным за наблюдаемые различия значений ЯМР. Во-вторых, использование первичных культур дало возможность нам установить, что различия, обнаруженные в тканях, прежде всего отражают изменения, происходящие в клетках паренхимы, а не в клетках стромы или жировых клетках. В-третьих, скорость роста и число делящихся клеток во всех исследуемых культурах были одинаковыми (Das

et. al., 1974; Voyles, McGrath, 1976), поэтому маловероятно, что установленные различия значений ЯМР обусловлены этими факторами.

Следует отметить предостережение нескольких исследователей, указывающих на поразительные различия, существующие между свойствами клеток первичных культур нормальной ткани, предопухолевой и опухолевой тканей молочной железы и клеток стабильных линий этих тканей. Примером таких различий могут являться результаты ЯМР-исследований, в которых значения T_1 и T_2 протонов воды были короче в культурах трех стабильных линий по сравнению с таковыми первичных культур (см. табл. 7). Клетки опухолевых линий также отличаются от таковых первичных культур независимо от неопластического состояния, морфологии, топографии поверхности, обнаруженных с помощью сканирующего электронного микроскопа (Medina et. al., 1979), агглютинабельности лектинами (Asch, Medina, 1978), связи с фибронектином (Asch et. al., 1980); индукции многоядерности под влиянием цитохолазина В (Medina et. al., 1980a) и др. Не ясно, обусловлены ли эти фенотипические признаки опухолевых клеток адаптацией к длительному культивированию в искусственной окружающей среде, селекцией субпопуляций клеток из исходной массы опухоли или прогрессией малигнизации клеток. Однако, когда такие свойства, как изменения ЯМР-параметра и содержания фибронектина (Asch et. al., 1980) клеток молочной железы, растущих in vivo, сравнили с таковыми клеток, культивируемых in vitro, в результате была получена сильная корреляция между характеристиками клеток в тканях и первичных культурах. Таким образом, фенотип клеток первичных культур молочной железы, растущих in vitro, и фенотип клеток ткани молочной железы, растущих in vivo, очень близки.

В настоящее время механизм изменения времени релаксации протонов воды в опухолевых клетках не известен. Современные объяснения уменьшения значений T_1 и T_2 протонов воды в живых клетках по сравнению со значениями чистой воды ($T_1$300 мс) основаны на взаимодействии молекул воды и поверхностей макромолекул внутри клеток. Мембраны, хроматин, микротрубочки, интерфиламенты, микрофиламенты могут взаимодействовать с водой, понижая в среднем свободу движения клеточной воды (Ranade et. al., 1975, 1976; Peemoeller et. al., 1979; Rustz et. al., 1978). При иммунофлюоресцентном и электронно-микроскопическом исследованиях микрофиламентов и микротрубочек в нормальных, предопухолевых и опухолевых клетках молочной железы не обнаружено никаких различий этих типов клеток (Asch et. al., 1979b). Хотя количественно нельзя определить соотношение полимеризованного и неполимеризованного актина и тубулина, недавно проведенная серия экспериментов показала, что эти элементы цитоскелета функционально не различаются в нормальных и опухолевых клетках молочной железы (Asch et. al., 1980) (табл. 8). В противоположность этому состав белков промежуточных филаментов опухолевых клеток, который был установлен с помощью двухмерного электрофореза в геле, отличался от такового нормальных и предопухолевых клеток молочной железы. В этих элементах опухолевых

Таблица 8. **Свойства эпителиальных клеток молочной железы in vivo и in vitro**

Свойства	Результаты сравнения данных нормальных, HAN и опухолевых клеток	Ссылка
Морфология и структура		
Клеточные размеры, форма	Аналогичные in vivo и in vitro	Das et al. (1974) Voyles, McGrath (1976) Pickett et al. (1975)
Ядерно-цитоплазматическое отношение	Аналогичные in vivo и in vitro	
Связывающие комплексы	Аналогичные in vivo и in vitro	Pickett et al. (1975)
Ультраструктурная характеристика	Аналогичные in vivo и in vitro	Pickett et al. (1975)
Топография поверхности (по данным сканирующего электронного микроскопа)	Аналогичны in vitro	Medina et al. (1979)
Микротрубочки и микрофиламенты	Аналогичны in vitro	Asch et al. (1979b)
Содержание фибронектина	Одинаково in vivo и in vitro в нормальных и HAN клетках; значительно снижено в опухолевых клетках	Asch et al. (1980)
Биохимические		
Гормоночувствительность	Положительная для нормальных клеток, изменена в HAN	Abraham, Bartley (1974)
Продукция вирусов	Аналогичны in vivo	Abraham, Bartley, (1974)
Гистоны	Аналогичны in vivo	
Негистоновые хромосомные белки	Количественно отличаются между нормальными, HAN и опухолевыми клетками in vivo	
Отношение ДНК/РНК	Аналогичны in vivo	
Скорость восстановления ДНК	Аналогичны in vivo	Abraham, Bartley (1974)
Метаболизм углеводов	Аналогичны in vivo	Abraham, Bartley (1974)
Метаболизм липидов	Различный у всех трех типов клеток in vivo	Braham, Bartley (1974)
Изозимный спектр (ЛДГ-3, ГДФГ-1)	Повышается в HAN и опухолевых клетках in vivo	Abraham, Bartley (1974)
Апикальная щелочная фосфатаза	Выше в опухолевых клетках in vivo	Abraham, Bartley (1974)
Время релаксации, измеренное ЯМР, T_1 и T_2	Различное для всех типов клеток in vivo и in vitro В нормальных тканях и клетках самое низкое	Hazlewood et al. (1974), Beall et al. (1980)
Взаимодействие с лектинами	Аналогичны in vitro	Asch, Medina (1978) Asch et al. (1980)
Продукция казеина	Выше в нормальных клетках, ниже в опухолевых клетках in vivo и in vitro	Suppowiet et al. (1980)

Свойства	Результаты сравнения данных нормальных, HAN и опухолевых клеток	Ссылка
Транспорт Na^+	Выше в опухолевых клетках in vitro	Shen et al. (1978)
Активность Mg^{++}-зависимой АТФазы	Аналогичны в нормальных и опухолевых клетках in vivo и in vitro	Russo et al. (1977)
Активность зависимой АТФазы	Связаны только с миоэпителиальными клетками	Russo et al. (1977)
Активность Na^+, K^+-зависимой АТФазы	Связаны только с миоэпителиальными клетками	
Белки промежуточных филаментов	Аналогичны в нормальных и HAN клетках; некоторые отсутствуют или их количество снижено в опухолевых клетках	Asch et al. (1979a)
Рост in vitro		
Скорость роста	Аналогичны	Das et al. (1974), Voyles, McGrath (1976)
Плотность насыщения	Аналогичны	Das et al. (1974), Voyles, McGrath (1976)
Влияние плотности на торможение движения	Аналогичны	Das et al. (1974), Voyles, McGrath (1976)
Ингибирование синтеза ДНК в зависимости от плотности	Аналогичны в нормальных и HAN клетках, снижено в опухолевых клетках	Hosick (1974)
Рост в многоклеточных сфероидах	Способны все три типа клеток. Несколько лучше растут HAN и опухолевые клетки	Medina et al. (1980b)
Многоядерность, индуцируемая в клетках цитохалазином В	Больше в опухолевых клетках, аналогична в нормальных и HAN клетках	Medina et al. (1980a)
Утрата способности прикрепления к субстрату	Не коррелируют с опухолеобразованием опухолевых клеток	Butel et al. (1977)

клеток отсутствует примерно около трех — пяти белков, которые имеются в нормальных и предопухолевых клетках (Asch et. al., 1979b). Значение этих различий и их связь с параметрами ЯМР остается еще выяснить. Внутренние белки решетки филаментов, такие, как микротрабекулярные, описанные Wolosewick и Porter (1976), могут также взаимодействовать с водой и уменьшать ее подвижность.

В заключение надо отметить высокую характеристичность изменений значений T_1 и T_2 в первичных культурах нормальной, предопухолевой и опухолевой тканей, несмотря на то что невозможно определить, какая часть клеток вносит основной вклад в эти изменения (см. табл. 5). Недолго культивируемые первичные культуры нормаль-

ных предопухолевых и опухолевых клеток, которые перевивались обратно мышам, давали рост исходному типу ткани, в которой наблюдались различия между T_1 и T_2, хотя менее выраженные (см. табл. 6). Повышение T_1 и T_2 протонов воды в ткани, находящейся в предопухолевом состоянии, и опухолях молочной железы не обусловлено только повышением гидратации этих трех типов клеток молочной железы мышей. Результаты, полученные на первичных культурах, свободных от осложняющих факторов, показали, что различия показателей клеток связаны со степенью и типом взаимодействия воды и макромолекул.

9.5. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Abraham S., Bartley J. C. (1974). Comparison among the metabolic characteristics of normal, preneoplastic, and neoplastic mammary tissues. In «Hormones and Cancer» (K. W. McKerns, ed.), pp. 29—74. Academic Press, New York.

Asch B., Medina D. (1978). Concanavalin A — Induced agglutinability of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary cells. J. Natl. Cancer Inst., 61, 1423—1430.

Asch B., Leonardi C., Burstein N. A., Rubin R. W. (1979a). Analysis of cytoskeletal models from normal and neoplastically transformed cells. J. Cell Biol. **83**, 470a.

Asch B., Medina D., Brinkley B. R. (1979b). Microtubules and actin containing filaments of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary gland. Cancer Res. 39, 893—907.

Asch B., Kamat B., Burstein N. A. (1980). Deposition of fibronectin in normal, dysplastic and malignant mammary tissues and cell cultures. Submitted for publication.

Beall P. T., Hazlewood C. F., Rao P. N. (1976a). Nuclear magnetic resonance patterns of intracellular water as a function of HeLa cell cycle. Science **192**, 904—907.

Beall P. T., Cailleau R. M., Hazlewood C. F. (1976b). The relaxation times of water protons and division rate in human breast cancer cells: A possible relationship to survival. Physiol. Chem. Phys. 8, 281—284.

Beall P. T., Medina D., Chang D. C., Seitz P. K., Hazlewood C. F. (1977). A systemic effect of benign and malignant mammary cancer on the spin-lattice relaxation time, T_1, of water protons in mouse serum. J. Natl. Cancer Inst. **59**, 1431—1433.

Beall P. T., Asch B. B., Chang D. C., Medina D., Hazlewood C. F. (1980). Distinction of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary primary cell cultures by water nuclear magnetic resonance relaxation time. J. Natl. Cancer Inst. **64**, 335—338.

Bloch F., Hansen W. W., Packard M. (1946). The nuclear induction experiment. Phys. Rev. 70, 474—485.

Block R. E. (1973). Factors affecting proton magnetic resonance linewidths of water in several rat tissues. FEBS Lett. **34**, 109—112.

Bovee W., Huisman P., Smidt J. (1974). Tumor detection and nuclear magnetic resonance. J. Natl. Cancer Inst. **52**, 595—598.

Butel J. S., Dudley J. P., Medina D., et al. (1977). Comparison of the growth properties in vitro and transplantability of continuous mouse mammary tumor cell lines and clonal derivatives. Cancer Res. **37**, 1892—1900.

Carr H. Y., Purcell E. M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. Phys. Rev. **94**, 630—638.

Chaughule R. S., Kasturi S. R., Ranade S. S. (1974a). Proton spin-lattice relaxation times and water content in human tissues. Proc. Nucl. Phys. Solid State Phys. Symp. 17c.

Chaughule R. S., Kasturi S. P., Vijayaraghavan R., Ranade S. S. (1974b). Normal and malignant tissues — An investigation by pulsed nuclear magnetic resonance. Indian J. Biochem. Biophys. **11**, 256—258.

Cope F. W. (1969). Nuclear magnetic resonance evidence using D20 for structured water in muscle and brain. Biophys. J. **9**, 303—319.

Cramer W. (1916). On the biochemical mechanism of growth. J. Physiol. (London) **50**, 322—334.

Damadian R. (1971). Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science **171**, 1151—1153.

Damadian R., Zaner K., Hor D. (1973). Human tumors by NMR. Physiol. Chem. Phys. **5**, 381—402.

Damadian R., Zaner K., Hor D. (1974). Human tumors detected by nuclear magnetic resonance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 1471—1473.

Damadian R., Goldsmith M., Minkoff L. (1977). NMR in cancer. XVI. Fonar image of the live human body. Physiol. Chem. Phys. **9**, 97—100.

Das N. K., Hosick H. L., Nandi S. (1974). Influence of seeding density on multicellular organization and nuclear events in cultures of normal and neoplastic mouse mammary epithelium. J. Natl. Cancer Inst. **52**, 849—861.

Dodd H. J. F. (1975). Electron spin resonance study of changes during the development of a mouse myeloid leukemia. I. Paramagnetic metal ions. Br. J. Cancer **32**, 108—120.

Downing J. E., Christopherson W. M., Broghamer W. L. (1962). Nuclear water content during carciogenesis. Cancer (Philadelphia) **15**, 1176—1180.

Economou J. S., Parks L. C., Saryan L. A. (1973). Detection of malignancy by nuclear magnetic resonance. Surg. Forum **24**, 127—129.

Ekstrand K. E., Dixon R. L., Raben M., Ferree C. F. (1977). Proton NMR relaxation in the peripheral blood of cancer patients. Phys. Med. Biol. **22**, 925—931.

Farrar T. C., Becker E. D. (1971). «Pulse and Fourier Transform NMR». Academic Press, New York.

Floyd R. A., Leigh J. S., Chance B., Miko M. (1974). Time course of tissue water proton spin-lattice relaxation in mice developing ascites tumor. Cancer Res. **34**, 89—91.

Floyd R. A., Yoshida T., Leigh J. S. (1975). Changes in tissue water proton relaxation rates during early phases of chemical carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**, 56—58.

Frey H. W., Knispel R. R., Kruvv J., Sharp A. R., Thompson R. T., Pintar M. M. (1972). Proton spin-lattice relaxation studies of non-malignant tissues of tumorous mice. Natl. Cancer Inst. **49**, 903—906.

Gilbert S. F., Migeon B. R. (1975).— Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. Cell **5**, 11—17.

Goldsmith M., Koutcher J. A., Damadian R. (1978). NMR in cancer. XXIII. Application of NMR malignancy index to human mammary tumors. Br. J. Cancer **38**, 547—554.

Hazlewood C. F., Chang D. C., Medina D., Cleveland G., Nichols B. L. (1972). Distinction between the preneoplastic and neoplastic state of murine mammary glands. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **69**, 1478—1480.

Hazlewood C. F., Cleveland G., Medina D. (1974). Relationship between hydration and proton nuclear magnetic resonance relaxation times in tissues of tumor bearing and non-tumor bearing mice: Implications for cancer detection. Natl. Cancer Inst. **52**, 1849—1853.

Hodgkin A. L., Huxley A. F. (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fiber. Nature (London) **144**, 710—711.

Hollis D. P., Economou J. S., Parks L. C., Eggleston J. C., Saryan L. A., Czeisler J. L. (1973). Nuclear magnetic resonance studies of several experimental and human malignant tumors. Cancer Res. **33**, 2156—2160.

Hollis D. P., Saryan L. A., Economou J. S. (1974). Nuclear magnetic resonance studies of cancer. V. Appearance and development of a tumor systemic effect in serum and tissues. Natl. Cancer Inst. **53**, 807—815.

Hosick H. L. (1974). A note on growth patterns of epithelial tumor cells in primary culture. Cancer Res. **34**, 259—261.

Iijima N., Fujii N. (1972). Intermagn. Conf., Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo, Tokyo,

Iijima N., Saitoo S., Yoshida Y., Fujii N., Koike T., Osanai K., Hirose K. (1973). Spin-echo nuclear magnetic resonance in cancerous tissue. Physiol. Chem. Phys. 5, 431—435.

Inch W. R., McCredie J. A., Knispel R. R., Thompson R. T., Pintar M. M. (1974). Water content and proton spin relaxation times for malignant and nonmalignant tissues from mice and humans. Natl. Cancer Inst. 52, 353—356.

Kasturi S. R., Ranade S. S., Smita S. (1976). Tissue hydration of malignant and uninvolved human tissues and its relevance to proton spin-lattice relaxation mechanism. Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B. 84b, 60—74.

Kraehenbuhl J. P (1977). Dispersed mammary gland epithelial cells. I. Isolation and separation procedures. J. Cell Biol. 72, 390—405.

Ling G. N. (1962). «Physical Theory of the Living State». Blaisdell, Philadelphia, Pennsylvania.

McEwen H. D., Haven F. L. (1941). The effect of carcinosarcoma 256 on the water content of liver. Cancer Res. 1, 148—150.

Medina D. (1976a). Tumor producing capabilities of mammary dysplasias BALB/c mice. J. Natl. Cancer Inst. 57, 1185—1189.

Medina D. (1976b). Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. Cancer. Res. 36, 2589—2595.

Medina D., DeOme K. B. (1970). Effects of various oncogenic agents on tumor-producing capabilities of series D BALB/c mammary nodule outgrowth lines. J. Natl. Cancer Inst. 45, 353—363.

Medina D., Hazlewood C. F., Cleveland G., Chang D. C., Spjut H. J., Moyers R. (1975). Nuclear magnetic resonance studies on human breast dysplasias and neoplasms. J. Natl. Cancer Inst. 54, 813—818.

Medina D., Asch B. B., Brinkley B. R., Mace M. L., Jr. (1979). In vivo and in vitro models for transformation of breast cells. In «Eleventh Meeting on Mammary Cancer in Experimental Animals and Man» (M. Rich and C. McGrath, eds.), Academic Press, New York.

Medina D., Oborn C. J., Asch B. B. (1980a). Distinction between preneoplastic and neoplastic mammary cell populations in vitro by cytochalasin B-induced multinucleation. Cancer Res. 40, 329—333.

Medina D., Asch B. B., Oborn C. J. (1980b). Growth of normal, preneoplastic and neoplastic mouse mammary cells in multicellular spheroids. In preparation.

Meiboom S., Luz Z., Gill D. (1957). Proton relaxation in water. J. Chem. Phys. 27, 1411—1412.

Mellors R. C., Kupfer A., Hollender A. (1953). Quantitative cytology and cytopathology. Cancer (Philadelphia) 6, 372—384.

Odeblad E., Ingelman-Sundberg A. (1966). Proton magnetic resonance studies on the structure of water in the myometrium. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 44, 117—125.

Odeblad E., Bahr B. N., Lindstrom G. (1956). Proton magnetic resonance of human red blood cells in heavy water exchange experiments. Arch. Biochem. Biophys. 63, 221—225.

Peemoeller H., Schreiner L. J., Inch W. R., McCredie J. A., Pintar M. M. (1979). Proton T_1 study of coverage parameter changes in tissues from tumor bearing mice. Biophys. J. 25, 203—208.

Pickett P. B, Pitelka D. R., Hamamoto S. T., Misfeldt D. S. (1975). Occluding junctions and cell behavior in primary cultures of normal and neoplastic mammary gland cells. J. Cell. Biol. 66, 316—332.

Ranade S. S., Chaughule S., Kasturi S. R., Nad Karni J. S. Talwalkar G. V., Wagh U. V., Korgaonkar K. S., Vijayaraghavan R. (1975). Pulsed nuclear magnetic resonance studies on human malignant tissues and cells in vitro. Indian J. Biochem. Biophys. 12, 229.

Ranade S. S., Shah S., Korgaonkar K. S., Kasturi S. R., Chaughule R. S., Vijayaraghavan R. (1976). Absence of correlation between spin-lattice relaxation times and water content in human tumor tissues. Physiol. Chem. Phys. 8, 131.

Ranada S. S., Smita S., Advani S. H., Kasturi S. R. (1977). Pulsed nuclear magnetic resonance studies of human bone marrow. Physiol. Chem. Phys. 9, 297—299.

Ratkovic S., Rusov C. (1974). Magnetic relaxation of water protons in the detection of tissue changes induced by erythroleukosis, Period. Biol. 76, 19—23.

Russo J., Wells P. A., Russo I. H. A. (1977). Adenosine triphosphatases as histochemical markers for the cell of origin in experimental mammary carcinoma. Cancer Res. 37, 1088—1098.

Rustgi S. N., Peemoeller H., Thompson R. T., Kydon D. W., Pintar M. M. (1978). A study of molecular dynamics and freezing phase transition in tissues by proton spin relaxation. Biophys. J. 22, 439—452.

Saprin A. N., Nagler L. G., Koperina Y. V., Kriglyakova K. Y., Emanuel N. M. (1976). Kinetics of change in the content of free radicals in the blood and organs of mice with experimental leukemia — II. Biofizika 11, 706—708.

Sarayan L. A., Hollis D. P., Economou J. S., Eggleston J. C. (1974). Nuclear magnetic resonanse studies of cancer. IV. Correlation of water content with tissue relaxation times. J. Natl. Cancer Inst. 52, 599—602.

Schlottman H., Rubenow W. (1932). Uber der Wassergehalt der gewebe normaler und krebskranker Ratten. Z. Krebsforsch. 36, 120—125.

Shen S. S., Hamamoto S. T., Bern H. A., Steinhardt R. A. (1978). Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. Cancer Res. 38, 1356—1361.

Suppowit S. C., Asch B. B., Rosen J. M. (1980). Casein gene expression in normal and neoplastic mammary tissue. In «Advances in Breast Cancer Research» (M. Brennan, ed.). Academic Press, New York. In press.

Swift T. I., Fritz O. G. (1969). A proton spin-echo study of the state of water in frog nerves. Biophys. J. 9, 54—59.

Tooze R., ed. (1973). In «The Molecular Biology of Tumor Viruses», p. 351. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

Troshin A. B. (1966). «Problems of Cell Permeability». Pergamon. New York.

Voyles B. A., McGrath C. M. (1976). Markers to distinguish between normal and neoplastic mammary epithelial cells in vitro: Comparison of saturation density, morphology and concanavalin A reactivity. Int J. Cancer 18, 498—509.

Wagh U. V., Kasturi S. R., Chaughule R. S., Smita S. S., Ranade S. S. (1977). (Studies on proton spin-lattice relaxation time (T_1) in experimental cell cultures. Physiol. Chem. Phys. 9, 167—174.

White M. T., Hu A. S. L., Hamamoto S. T., Nandi S. (1978). In vitro analysis of proliferating opithelial cell populations from the mouse mammary gland: Fibroblast-free growth and serial passage. In Vitro 14, 271—281.

Wolosewick J. J., Porter K. R. (1976). Stereo high-voltage electron microscopy of whole cells of the human diploid line, WI—38. Am. J. Anat. 147, 303—323.

10

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ ЦИТОПЛАЗМЫ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Андреа М. Мастро и Алек К. Кейт

10.1.	Введение	301
10.2.	Методы	305
10.2.1.	Клетки	305
10.2.2.	Измеряемые параметры	307
10.3.	Результаты и обсуждение	309
10.3.1.	Подвижность спин-меток в модельных системах	309
10.3.2.	Подвижность спин-меток в клетках млекопитающих	311
10.4.	Заключение	315
10.5.	Указатель литературы	315

10.1. ВВЕДЕНИЕ

Клетки млекопитающих представляют собой комплекс различных молекул, из которых наиболее простой является вода. В водном окружении содержатся компоненты всевозможных размеров от маленьких ионов до огромных полимеров, комплекс ДНК — хроматин, микротрубочки, микрофиламенты, белки различной формы и размеров, а также мембраны, содержащие липиды и связанные с ними белки, являющиеся частью этих внутриклеточных систем. Во внутриклеточной водной среде все компоненты взаимодействуют друг с другом.

В последние несколько лет было вновь уточнено наличие полимерных комплексов, т. е. системы цитоскелета и цитофиламентов в цитоплазме, подтверждено, что цитоплазма клеток не является разведенным раствором небольших молекул. Большое количество этих полимеров или систем цитоскелета, так же как их широкая распространенность в разнообразных типах клеток млекопитающих, позволяет предполагать, что они выполняют основную роль в функционировании клеток. Действительно, такие системы не стабильны и изменяются в зависимости от состояния клеток, их роста и дифференцировки. В свою очередь, эти полимеры и большие молекулы должны влиять на движение воды и небольших молекул в цитоплазме. Действительно, состояние воды в клетках млекопитающих зависит от изменений

полимеров. Например, время релаксации воды, определяемое методом ЯМР, в живых клетках короче, чем в обычной воде, что говорит об увеличении вязкости воды (см. гл. 9 Beall et al.). Различные типы клеток имеют разное время релаксации. В одних и тех же клетках вода находится в разном состоянии в зависимости от их прохождения по клеточному циклу, а также в процессе конденсации хроматина, деполимеризации и самосборки микротрубочек и микрофиламентов (Beall et al., 1976).

В противоположность обширной информации о влиянии цитоплазматических структур на воду меньше известно о движении растворов в цитоплазме клеток. Возможно, роль клеточной надструктуры, а также содержания и организации связанной воды заключается в облегчении диффузии и локальных взаимодействий ионов и небольших молекул. С такой точки зрения цитоплазма клеток совершенно не изучена.

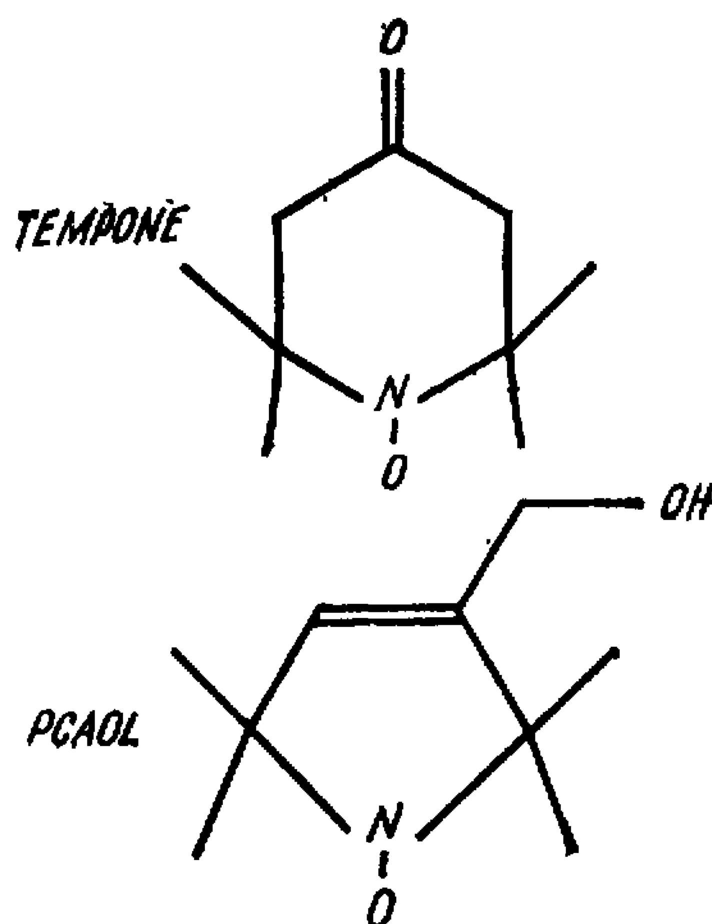
Представленный метод измерения трансляционной подвижности (D) с помощью спин-меток отличается от методов измерений классической или обычной диффузии.

Полученные методами, измеряющими обычную диффузию, результаты захватывают широкий диапазон значений, например, они покажут, что агаровый гель твердый. С помощью метода, основанного на использовании спин-меток, мы установили, что водная фаза в агаровом геле такая же текучая, как в равном объеме воды. Этот метод позволяет измерять диффузию в диапазоне от 20 ангстрем до нескольких сотен ангстрем и не зависит от текучести общей массы. С помощью ЯМР, в принципе, также можно измерять диффузию в сверхмикродиапазонах, но этот метод значительно менее чувствителен по сравнению с методом спин-меток. Описанные здесь исследования, проведенные с помощью спин-метки, дают косвенную информацию о клеточной воде. Так как спин-метки располагаются в водной фазе цитоплазмы, регистрируемое движение спин-меток ограничивается в связи с физическим состоянием воды. Спин-метки растворяются, а движение их молекул ограничивается вследствие следующих взаимодействий: раствор — раствор, раствор — клеточные структуры.

Электронный парамагнитный резонанс ЭПР), часто называемый в биологической литературе как электронный спиновый резонанс, позволяет определять наличие или свойства атомов или молекул, содержащих, по крайней мере, один неспаренный электрон. В некоторых обзорах, опубликованных в течение нескольких последних лет, описывается использование этой техники для исследования мембран и белков (Berliner, 1976). Использование спин-меток для изучения свойств цитоплазмы до некоторой степени ново (Keith, Snipes, 1974; Keith et al., 1977 a, b).

ЭПР — чувствительный метод, позволяющий измерять парамагнитные молекулы, называемые спин-метками, причем такие их низкие концентрации, как 10^{-7} М. Аналогичных сигналов, накладывающихся на сигнал спин-меток, в естественных биологических образцах не существует. С помощью относительно простых химических методик был синтезирован широкий набор различных спин-меток (Berliner,

Рис. 1. Структура двух спин-меток. Показаны структурные формулы двух спин-меток, используемых в настоящем исследовании: TEMPONE — 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксил; PCAOL-2,2,5,5 тетраметил-3-карбоксипирролин-N-оксил.



1976), таким образом, доступность спин-меток не ограничивает возможности экспериментов.

На рис. 1 показаны две спин-метки, используемые в настоящем исследовании, которые представлены в качестве примера структуры спин-меток. Основная характеристика структуры спин-меток — высокоэкранированный окисленный атом азота (группы NO). Эта структурная конфигурация стабильного свободного радикала парамагнитна. Природа сигнала ЭПР позволяет измерять несколько параметров, которые дают информацию о физических свойствах и микроокружении спин-меток. Спин-метки могут быть размещены на различных органических молекулах в пределах от небольших молекул до белков, углеводов, полинуклеотидов. Различия спектров ЭПР спин-меток зависят от влияния на них микроокружения. Одним из наиболее распространенных параметров ЭПР является постоянная сверхтонкого взаимодействия, позволяющая регистрировать изменения полярности среды выше на несколько десятых нанометра от поверхности спин-метки. Этот параметр определяется измерением магнитного поля между низкими и средними резонансными его линиями, выраженного в Гс. Типичные значения 16,3 Гс для TEMPONE в воде и 14,5 Гс для TEMPONE в гексане. Спин-метки, растворимые в углеводородах, будут давать значения A_N, типичные для углеводородных растворителей в водно-масляных эмульсиях.

Вращательная подвижность спин-меток определяется производным параметром — временем вращательной корреляции (τ_c), широко используемым для измерений вязкости среды окружения метки. Оно характеризует сумму всех ограничений вращательного движения метки. Для сферических молекул с одинаковым обменом и массой распределение осей вращения является случайным. Такой тип вращательного движения называется изотропным. Молекулы, не имеющие сферической симметрии, вращаются вокруг одной или нескольких определенных осей. Такой тип вращательного движения называют анизотропным.

В дополнение к данным о полярности вязкости среды, окружающей спин-метки, их вращательной подвижности у экспериментаторов имеется также возможность измерять скорость исчезновения сигнала вследствие присоединения атома водорода к нитроксильной группе спин-метки. Клетки различных организмов, в том числе и млекопитающих, могут вызывать исчезновение сигнала на протяжении

различных интервалов времени в пределах (от минут до суток), зависящих от типа клеток и структуры спин-метки.

Параметр спинового обмена определяется частотой столкновений спин-меток. Используется он для измерения трансляционной диффузии. При одинаковой концентрации частота столкновения спин-меток зависит от вязкости микроокружения.

В действительности спектр сигналов спин-метки отражает поглощение ею микроволновой энергии. Резонансные условия, в которых происходит это поглощение, достигаются путем размещения образца, содержащего спин-метки в резонаторе ЭПР-спектрометра, где через образец под прямым углом друг к другу проходят магнитное поле и микроволновое облучение. Когда частота микроволновой энергии и магнитное поле H достигают значений собственной энергии, наступает поглощение и сигнал может быть зарегистрирован. При обработке спектров учитываются амплитуда сигнала, ширина линии, расстояние между линиями. С помощью точного измерения амплитуды и ширины линии может быть вычислен показатель τ_c. Показатели, связанные с трансляционной диффузией, могут быть вычислены по данным ширины линии спектра. Все эти параметры описаны более полно в представленных подразделах.

Связанные с применением спин-меток методы позволяют получать информацию как о вращательном, так и о трансляционном передвижении молекул. Вращательная подвижность оценивается временем вращательной корреляции τ_c и прямо вычисляется по параметрам спектров. Широкое обсуждение этого показателя представлено в литературе и в общем оценивается как надежная величина (Kivelson, 1960). Трансляционная диффузия определяется по параметру спинового обмена. В литературе хорошо разработана теория трансляционной диффузии (Kivelson, Collins, 1962; Freed, 1966; Miller et al., 1966; Plachy, Kivelson, 1967; Eastman et al., 1970; Anisimov et al., 1971; Salikov et al., 1971), в частности использование спин-меток для измерения двухмерной диффузии в мембранах (Sackmann, Träuble, 1972a, b; Träuble, Sackmann, 1972; Devaux et al., 1973; Devaux, McConnell, 1972; Barnett, Grisham, 1972; Scandella et al., 1972) и в водной среде (Keith et al., 1977a, b).

Спин-метки широко применяются при исследовании структуры изолированных белков и мембран. С помощью гидрофобных спин-меток широко изучали модельные липидные мембраны, многослойные фосфолипидные пленки и выделенные из клеток фракции мембран; менее широко — мембраны интактных клеток. Использование гидрофильных спиновых меток в качестве зондов для изучения свойств водной фазы клеточной цитоплазмы начато позднее и продолжается до настоящего времени (Keith, Snipes, 1974; Morse et al., 1975; Henry et al., 1976; Hammerstedt et al., 1976, 1978).

Объектом для изучения биологических систем с применением спин-меток были главным образом модельные мембраны, а также биологические мембраны и белки. Исследования мембран были сконцентрированы на изучении их молекулярной организации, общих представлений о «текучести» мембран и фазовых перестроек или фа-

зового разделения различных областей в мембранах. Целью исследования белков с помощью спин-меток было изучение тонких структурных особенностей молекул белков. Успех исследований мембран и белков основан на расположении соответствующих спин-меток в определенных местах. Например, гидрофобные зоны мембран, граница между углеводородной и водной фазой, полярная зона мембран или водная фаза вблизи поверхности мембран — все это места, которые могут быть избирательно изучены с помощью спин-зондов. Эти исследования направлены на получение полезной информации о таких свойствах мембран, как локальные полярность, препятствия вращательному движению, температура, при которой происходит изменение фазового состояния компонентов мембран и другие производные параметры, относящиеся к физическим свойствам мембран.

10.2. МЕТОДЫ

10.2.1. Клетки

10.2.1.1. Культура

В большинстве экспериментов использовались клетки почек новорожденных хомячков (ВНК) Swiss 3T3 и трансформированные SV40 клетки Swiss 3T3. В некоторых экспериментах мы также использовали клетки BALB/c 3T3 и трансформированные SV40 клетки 3T3, полученные от доктора Paula Beall (Baylor College of Medicine) и BALB/c 3T3, SV40 3T3 и трансформированные метилхолантреном 3T3, полученные от доктора Robert Scott (University of Minnesota). Клетки для пересадки брали при низкой плотности клеток в модифицированной Дюльбекко среде Игла (DMEM) со стрептомицином (10 мг/мл) и пенициллином (100 единиц/мл), также с 10 % сыворотки теленка или 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и культивировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO_2. ВНК и SV40 3T3-клетки метили в экспоненциальной фазе роста. Клетки 3T3 были использованы также в качестве покоящейся культуры или синхронизированной в G_1-фазе, как это было сделано в отдельных экспериментах.

10.2.1.2. Введение спин-меток

Все последующие операции выполняли при комнатной температуре. Из чашек для культивирования диаметром 100 мм с приготовленными для введения спин-меток клетками удаляли 1—2 мл среды. Клетки собирали с поверхности чашек резиновым силиконированным валиком (скрепером) и взвешивали в оставшейся среде. Взвесь клеток из нескольких чашек собирали и центрифугировали (300 g, 6 мин). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в кондиционированной среде до концентрации $3—10 \times 10^6$ клеток/мл. Один миллиметр полученной взвеси клеток отбирали пипеткой и переносили в стеклянную пробирку размером 12×75 мм, центрифугировали, а надосадочную жидкость осторожно удаляли.

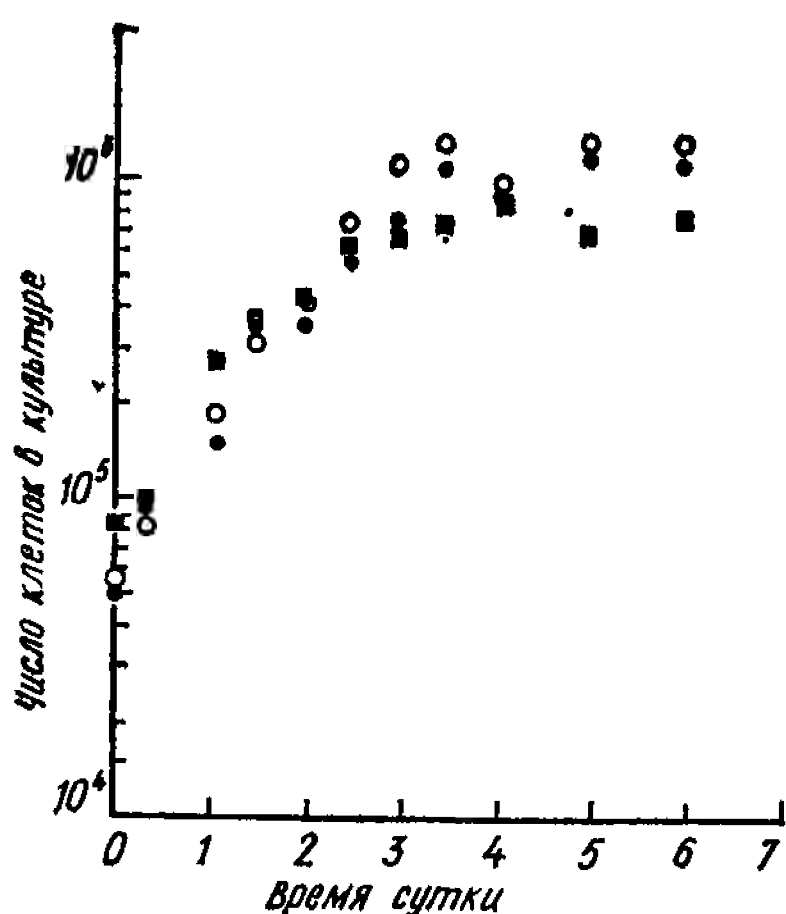


Рис. 2. **Влияние $NiCl_2$ на рост клеток ЗТЗ.** Клетки были посажены в числе 5×10^4 на 60-миллиметровую чашку в модифицированной Дюльбекко среде Игла с 10 % эмбриональной сывороткой теленка. Затем через сутки среду убрали, а клетки дважды промыли в 0,9 % NaCl. Один мл 100 мМ $NiCl_2$ или 0,9 % NaCl был добавлен на 10 мин в чашки с отмытыми клетками. Потом клетки снова дважды отмывались 0,9 % NaCl, в чашки добавляли среду и помещали в термостат при температуре 37°C. В третьем варианте эксперимента клетки оставались интактными. В течение 7 сут, через 12 ч подсчитывали число клеток в дублирующих культурах. Культура достигала состояния насыщения при $3—4 \times \times 10^4$ клеток/см² (●) 100 мМ $NiCl_2$; (○) 0,9% NaCl; (■) интактные клетки. По оси ординат — число клеток в культуре, по оси абсцисс — время (сутки).

Приблизительно 40 мкл среды остается в каждом осадке. Клетки нежно встряхивали и спин-метку, $NiCl_2$ и H_2O быстро добавляли к этому образцу. Приготовленную суспензию клеток втягивали в 100-микролитровую капиллярную стеклянную пипетку. Конец пипетки, противоположный клеткам, быстро запаивали в пламени, охлаждали, а затем центрифугировали (ротор № 5 на клинической центрифуге IEC) в течение 1 мин для осаждения клеток. Надосадочную жидкость отсасывали тонкой капиллярной пипеткой, а образец размещали в резонаторе ЭПР-спектрометра для анализа. Приблизительно 6 мин проходит от добавления спин-метки и $NiCl_2$ до конца записи сигнала. Спин-метки, используемые в этих исследованиях, были PCAOL или TEMPONE (их структура показана на рис. 1).

Длительная экспозиция клеток с $NiCl_2$ может быть токсичной. В связи с этим было проверено действие $NiCl_2$ в течение короткого времени на рост и жизнеспособность клеток. Спустя 24 ч после пересадки клеток в DMEM и 100 % сыворотки ЗТЗ-клетки были обработаны 100 мМ $NiCl_2$ или 0,9 % NaCl в течение 10 мин. Клетки отмывали 0,9 % NaCl и проверяли их жизнеспособность в тесте на реакцию трипановым синим. Больше чем 99 % клеток после инкубации в течение 10—30 мин с $NiCl_2$ не окрашивались трипановым синим.

Эксперименты по изучению влияния на рост $NiCl_2$ проводили следующим образом. Свежую среду с 10 % сыворотки добавляли снова к обработанным $NiCl_2$ клеткам, которые выдерживали в термостате при температуре 37 °C в течение недели. В качестве контроля служили клетки, к которым добавляли 0,9 % NaCl, а также интактные клетки. По мере роста культуру обрабатывали трипсином и подсчитывали число клеток.

Скорость роста клеток во всех трех случаях была одинакова (рис. 2). В этих экспериментах плотность насыщения приблизительно 3×10^4 клеток/см² достигалась на 3-е сутки. Аналогичные результаты были получены при изучении влияния $NiCl_2$ на клетки ВНК.

10.2.2. Измеряемые параметры

10.2.2.1. Время вращательной корреляции

Время вращательной корреляции (τ_c) используется в качестве параметра, определяющего свободу вращательной подвижности спин-метки. Определяемый параметр τ_c дает незначительные отличия в числовых значениях для различных спин-меток, обусловленных свойственными им факторами. Эти отличия не представляют серьезной проблемы и в практике одни и те же спин-метки используются в сравнительных экспериментах. Величина τ_c определяется по формуле

$$\tau_c = 6{,}5 \times 10^{-10} W_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right], \qquad (1)$$

где W_0 — ширина первой производной средней линии; h_0 и h_{-1} — амплитуды средне- и высокопольной первой производной спектра поглощения; $6{,}5 \times 10^{-10}$ — постоянная числовой пропорциональности, полученная с помощью общей обработки Кивелсона (Kivelson, 1960). Общие ограничения, которые накладываются на показатели τ_c, вытекают из уравнения Стокса — Эйнштейна, приведенного ниже:

$$\tau_c = \frac{4\pi r^3 \eta}{3kT}. \qquad (2)$$

Оно указывает, что объем (молекулярной формой пренебрегаем, так как в представленных спин-метках она близка к сферической) вращающейся молекулы, которая преодолевает вязкость η при температуре T, выраженной в К, определяет значение τ_c. Это должно указывать на то, что значения τ_c снижаются благодаря молекулярным силам, которые действуют на относительно коротких расстояниях от поверхности вращающейся молекулы.

10.2.2.2. Параметры трансляционной диффузии

Общую диффузию D можно определить различными способами, например уравнением общей диффузии Стокса —

$$D = \frac{kT}{6\pi r \eta}, \qquad (3)$$

где k — постоянная Больцмана.

Это уравнение отражает движение молекул в среде. Константа диффузии D, вычисленная по приведенному выше или другому способу определения, связана со скоростью движения фронта молекул. Фронт движения молекул определяется размером градиента концентрации dC/dX. Градиент концентрации образуется вследствие того, что концентрация представляющего интерес растворенного вещества C уменьшается на протяжении некоторого линейного промежутка времени X. Эта локальная концентрация растворенного вещества будет диффундировать до тех пор, пока не образуется равномерная дисперсия. После образования равномерной дисперсии большинство методов измерения диффузии не могут ее зарегистрировать, хоть диффузия

в этой дисперсии продолжается. Как и раньше, молекулы продолжают перемещаться относительно друг друга. Предлагаемый здесь метод спиновых меток служит для определения диффузии в такого рода дисперсиях. Определенной концентрации спин-меченые молекулы в определенной жидкой среде будут с определенной частотой сталкиваться друг с другом. В разбавленных растворах почти все такого рода столкновения спин-меченых молекул будут биомолекулярными. Частота столкновений C_f среди спин-меченых молекул ограничивается концентрацией этих молекул M_{SL} вязкостью растворителя η и температурой раствора. В изотропной среде удвоение величины M_{SL} должно приводить к двукратному увеличению частоты столкновений. В изотропной среде при постоянной температуре отношение C_f/M_{SL} должно иметь постоянное значение. Отсюда уравнение для определения диффузии D с помощью параметров спин-меток будет иметь следующий вид:

$$D_{SL} = \frac{KC_f}{M_{SL}}, \tag{4}$$

где K — константа пропорциональности, равная 2×10^{-14} (Keith et al., 1977в). Частота столкновений C_f определяется по зависимому от концентрации уширению линии ΔH

$$C_f = 2\Delta H, \tag{5}$$

так как только столкновения между молекулами с противоположными спинами приводят к уширению линии. Обычно величина D_{SL} вычисляется из уравнения

$$D_{SL} = \frac{K\Delta H}{M}. \tag{6}$$

Значения ΔH показывают изменение ширины линии вследствие спин-спинового взаимодействия меток и определяется по формуле

$$\Delta H = \Delta H_M - \Delta H_{min}, \tag{7}$$

где ΔH_M — ширина линии данной молярной концентрации; ΔH_{min} — минимальная ширина линии очень разбавленных спин-меток (10^{-5} М и менее), а ΔH — ширина линии, отражающая концентрацию спин-метки. В изотропной среде полученные значения D_{SL} хорошо соответствуют размеру диффузии D, определенной классическими методами. В гетерогенной среде, где могут существовать барьеры для продольного передвижения молекул, значения D_{SL} и D не согласуются.

10.2.2.3. Одновременное измерение τ_c и D_{SL}

При необходимости получить значения τ_c и D_{SL} это можно сделать на одном и том же спектре и в одно и то же время. В изотропной среде отношение D_{SL}/τ_c должно иметь одинаковое постоянное значение. В анизотропной среде возможно снижение этого отношения. D_{SL} определяется силами межмолекулярных взаимодействий, оперирующими на расстоянии, немного большем, чем диаметр вращающейся сферической молекулы растворенного вещества. Их значения

могут быть приблизительно вычислены из уравнения пространства кубической решетки

$$S = \frac{(10^{27}\,\text{Å}^3/N)^{1/3}}{(M_{SL})^{1/3}},$$

где N — число Авогадро, а M_{SL} — молярная концентрация спин-меченых молекул. В гетерогенной среде, в которой существуют препятствия для диффузии, значение D_{SL} может быть много меньше расчетного. Так же, как при взаимодействии меток между собой, происходит обмен спинов, сопровождающийся уширением линии ΔH, при взаимодействии спин-меток с парамагнитными молекулами отмечается уширение линии, которое вносит свой вклад в общий сигнал спин-метки. С помощью не проникающих в клетку парамагнитных молекул, таких, как ионы Ni^{2+}, можно разделить сигналы спин-меток, располагающихся вне и внутри клетки. Это позволило использовать ионы Ni^{2+} в необходимом количестве, обычно изотонические или более низкие концентрации, в суспензии клеток культуры. При этом уширение линии первой производной сигнала происходит также в результате уменьшения его амплитуды, так как амплитуда сигнала обратно пропорциональна площади ширины линии. Оказалось, что 50—100 мМ Ni^{2+} обычно более чем достаточно для определения внеклеточного сигнала. Все описанные выше теоретические предпосылки были использованы в настоящем исследовании. Несомненно, Ni^{2+} отнюдь не только парамагнитная молекула, но и молекула, отвечающая требованиям агента, уширяющего линию внеклеточного сигнала.

10.3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

10.3.1. Подвижность спин-меток в модельных системах

Так как цитоплазма представляет собой совокупность органелл и молекул различных размеров, представлялось целесообразным смоделировать некоторые отдельные компоненты цитоплазмы путем приготовления различных водных растворов. Необходимо было продемонстрировать наглядность анализа параметров растворенного вещества (с помощью исследования подвижности спин-метки в растворах), таких, как размер молекул, их форма, концентрация и поверхностные свойства. В соответствии с поставленными задачами мы обсудим только некоторые из них. Такого рода параметры могли быть продемонстрированы путем исследования поведения спин-меток в концентрированных растворах сахарозы и в полиакриламидном геле. Одни молекулы (сахароза) — небольшие, хорошо растворимые в воде молекулы, другие, например полиакриламида,— линейные полимеры, образующие гель при комнатной температуре. Анализ молекулярной подвижности в этих двух средах оказался не таким простым, как казался на первый взгляд. В растворах сахарозы до 70 %-ной концентрации это можно было сделать легко. Приготовить растворы более высокой концентрации и тотчас же измерять в них молекуляр-

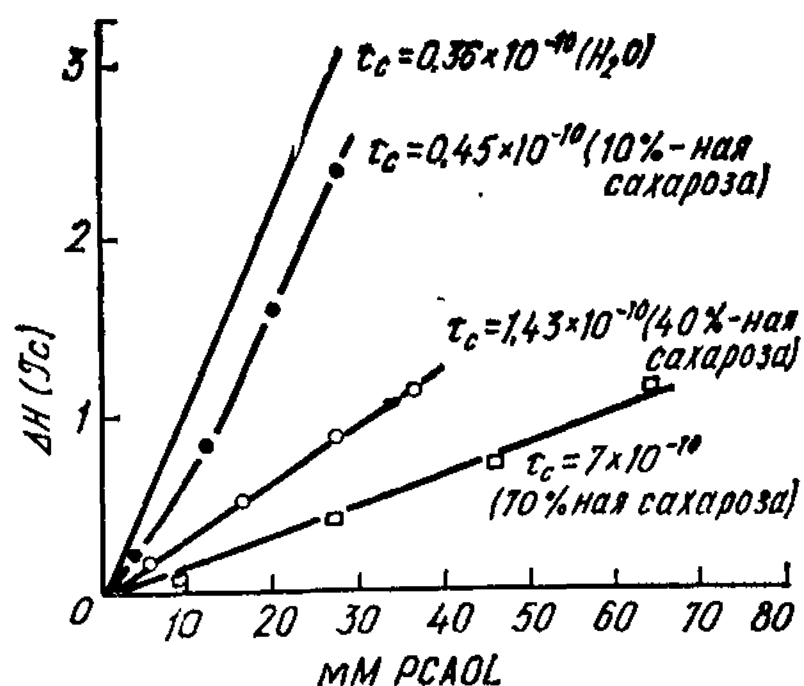


Рис. 3. Влияние сахарозы на подвижность спин-меток. Сплошной линией обозначено уширение линии спин-метки в зависимости от ее концентрации в воде при комнатной температуре; (●) — те же самые параметры в 10%-ном растворе сахарозы, (○) — 40%-ном, (□) — 70 %-ном. Процентами выражено отношение массы сахарозы к объему воды. ΔH (Гс) прямо пропорционально к диффузии в любой данной молярной концентрации спин-метки (см. уравнение (6)).

ную подвижность оказалось более сложно, так как этот параметр определяется частотой столкновения молекул спин-меток, а частота их столкновений зависит от расстояния между ними (см. уравнения (4) — (7)). Ради упрощения объем, занимаемый молекулами растворенного вещества в водных препаратах, обычно не учитывался. Ясно, что в препаратах, имеющих высокую концентрацию сахарозы, т. е. в которых сахароза преобладает, ее молекулы занимают в основном все пространство. В связи с этим расстояние между молекулами спин-меток в таком растворе сахарозы увеличивается несмотря на то, что концетрация их в водной фазе является постоянной. Регулируя концентрацию спин-меток в растворах сахарозы, далее можно увеличить концентрацию спин-меток в водной фазе, так как молекулы сахарозы будут уменьшать объем воды. Графики показывают влияние концентрации спин-меток на их подвижность в различных растворах сахарозы (рис. 3).

Препараты сахарозы были сделаны путем растворения определенной массы вещества в определенном объеме воды. Например, 10 г сахарозы смешивали с 90 мл воды и получали препарат 10 %-ной сахарозы. В этот раствор добавляли спин-метки, конечная концентрация которых показана на рис. 3. По представленным здесь результатам D/τ_c изменялось в сторону уменьшения по сравнению с расчетными данными для изотропной среды, в которой происходило аналогичное увеличение вязкости. Причины таких расхождений очевидны. 70 % препарата сахарозы состоит из 70 г сахарозы и 30 мл воды. Конечная концентрация спин-метки, добавленная к препарату, собирается в водной фазе (мы исключаем объем, занимаемый сахарозой) и она в 2,5 раза превышает равную концентрацию спин-метки, растворенной в воде.

В различных растворах сахарозы τ_c изменяется немногим больше, чем в 19 раз, в то время как D_{SL} только в семь раз (рис. 3). Если ввести поправки с учетом действительной концентрации спин-меток в водной фазе, то общие изменения D/τ_c будут очень незначительны. На основании этого можно сделать вывод, что водные препараты сахарозы относительно изотропны, но в такой системе, как клеточная цитоплазма, в которой не известен объем водной фазы и степень растворения спин-меток в связи с компартментализацией цитоплазмы полимерами. Поэтому подвижность спин-меток в общем растворе сахарозы надо рассматривать как полезную модель.

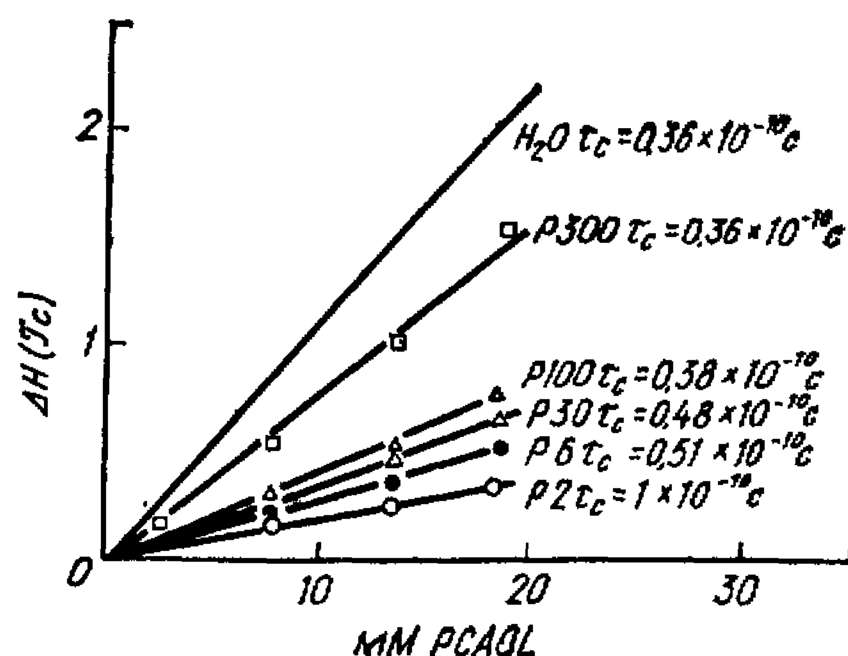


Рис. 4. Влияние ограниченного пространства на подвижность спин-меток. Упакованные полиакриламидные гранулы (BioRad) приготовлены путем добавления водной среды, содержащей определенную концентрацию спин-меток к гранулам обезвоженного полиакриламида. После смешивания препарат переносили в капилляр, один конец которого запаивали и центрифугировали для удаления межгранулярного водного пространства. Знак P обозначает эквивалент молекулярной массе сферической молекулы.

Полиакриламидный гель также может служить моделью для изучения влияния концентрации спин-меток в воде. Такого рода препараты готовили следующим образом. Сначала делали водные растворы спин-меток, а затем к ним добавляли обезвоженные гранулы геля. Водные препараты гранул центрифугировали в капиллярах с целью удаления межгранулярного водного пространства для измерения на ЭПР-спектрометре. Пространство, которое занимают молекулы полимера полиакриламида, не определяется как концентрационное или кубическое. В связи с этим полиакриламидные препараты не нуждаются в поправках на концентрацию спин-метки в воде. Данные этих экспериментов пригодны для прямой интерпретации (рис. 4).

Представленные на рис. 4 данные получены в водной среде, содержащей упакованные полиакриламидные гранулы с указанными размерами пор между ними. Изменения значений трансляционной диффузии ΔH были более существенными, чем значений времени вращательной корреляции τ_c. Гранулы полиакриламида обладали различными препятствующими факторами, которые прерывали в большей степени дальние, чем близкие, взаимодействия спин-меток. Поскольку D_{SL} связана с дальними спин-спиновыми взаимодействиями, она зависит от необходимых близких взаимодействий и процессов, ограничивающих свободу перемещения меток. При этом среднее расстояние, на которое перемещаются спин-меченые молекулы, значительно больше, чем расстояние между ними. Таким образом, хорошо видно, что величина D_{SL} должна быть чувствительной к любым факторам, прерывающим дальние спин-спиновые взаимодействия меток. Силы, которые ограничивают τ_c, оперируют на расстояниях немногим больше, чем диаметр спин-меченой молекулы, и поэтому, когда появляются такие препятствия, как в препаратах полиакриламида, частота взаимодействий увеличивается.

10.3.2. Подвижность спин-меток в клетках млекопитающих

Перемещение спин-меток в цитоплазме клеток ВНК при комнатной температуре в условиях изотонической среды свидетельствует о приблизительно трехкратном уменьшении вращательной подвижности и чуть меньше, чем двукратном уменьшении трансляционной диффузии по сравнению с движением в воде (рис. 5).

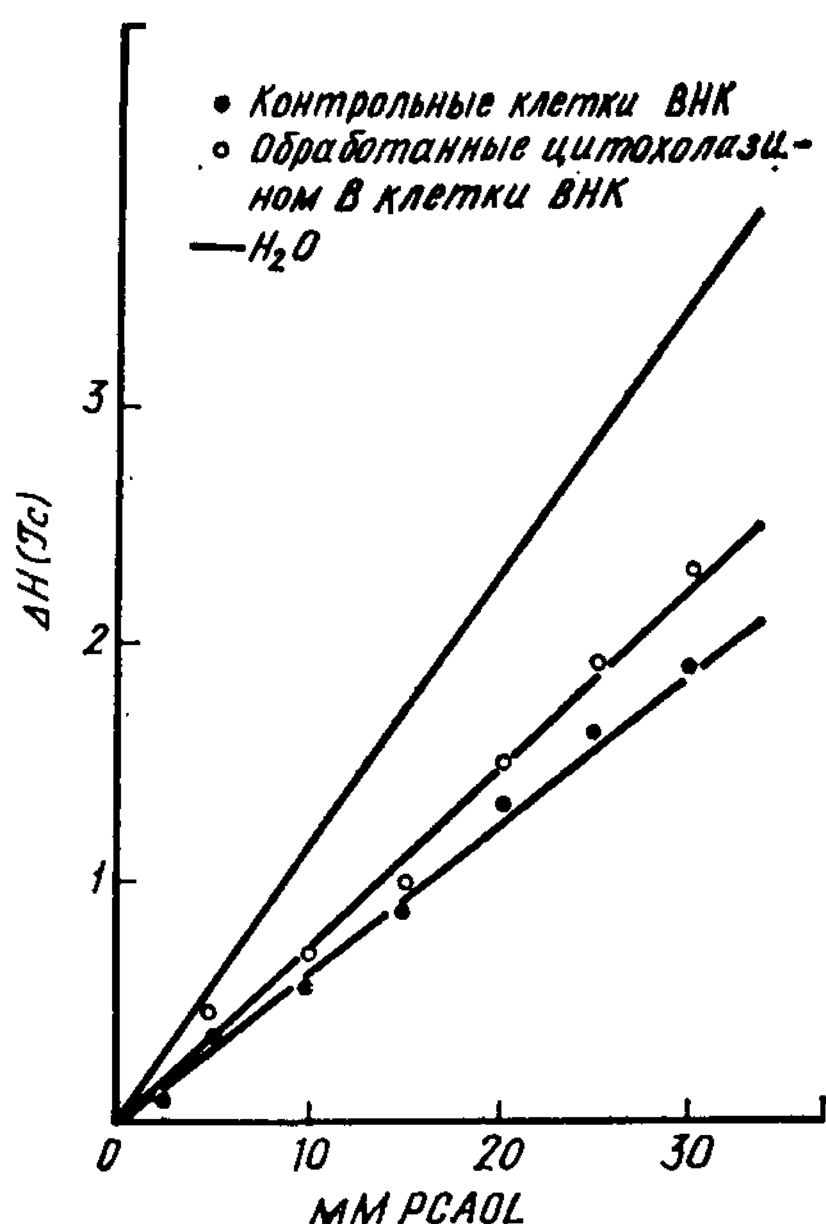


Рис. 5. Действие цитохалазина В на подвижность спин-меток в клетках ВНК. Одни клетки были обработаны 5 мкг/мл среды цитохалазином В в 0,4%-ном ДМСО за 5 ч до включения в них спин-меток. Другие клетки обрабатывали только 0,4%-ным ДМСО, третьи не обрабатывали. Обработка клеток ДМСО не оказывала влияния на подвижность спин-меток. PCAOL использовали в концентрациях, обозначенных на оси абсцисс. Показаны средние значения результатов пяти отдельных опытов. В таких экспериментах с 3Т3-клетками были получены аналогичные результаты. Контроль ВНК (●), цитохалазин В (○), H_2O (—).

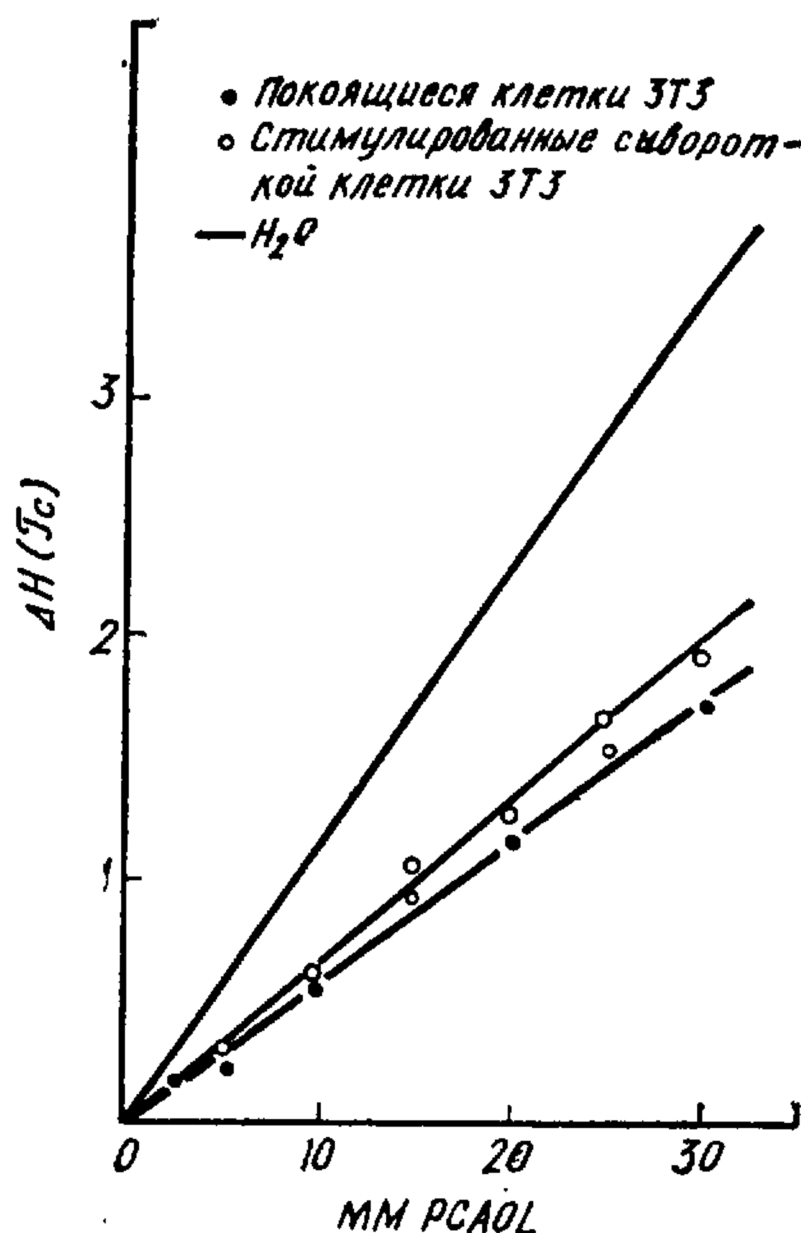


Рис. 6. Влияние фазы роста на подвижность спин-меток в 3Т3-клетках. 3Т3-клетки находились в стационарной фазе роста в среде с 5%-ным содержанием сыворотки. Увеличение содержания сыворотки до 10 % в некоторых культурах стимулировало переход клеток в G_1-фазу. Клетки собирали для введения спин-меток спустя 12 ч после стимуляции сывороткой. PCAOL использовали в концентрациях, показанных на оси абсцисс. Представлены средние данные четырех отдельных экспериментов.

Во всех клетках млекопитающих было обнаружено ограничение в большей степени вращательного, чем продольного перемещения спин-меток. Мы ожидали обратное исходя из результатов экспериментов с полиакриламидом. Цитохалазин В разрывает микрофиламенты в интактных клетках. Когда клетки ВНК были обработаны цитохалазином В, они имели круглую форму. Измерение движения спин-меток в таких клетках показало, что увеличивается значение D_{SL}, свидетельствующее о снижении числа препятствий для диффузии спин-меток в клетках, обработанных цитохалазином В (рис. 5). Мы наблюдали такой эффект действия цитохалазина В, как в клетках ВНК, так и 3Т3, но не в клетках 3Т3, трансформированных SV40. Когда покоящиеся конфлюэнтные 3Т3-клетки стимулировали добавлением в среду сыворотки, они значительно изменяли свою мор-

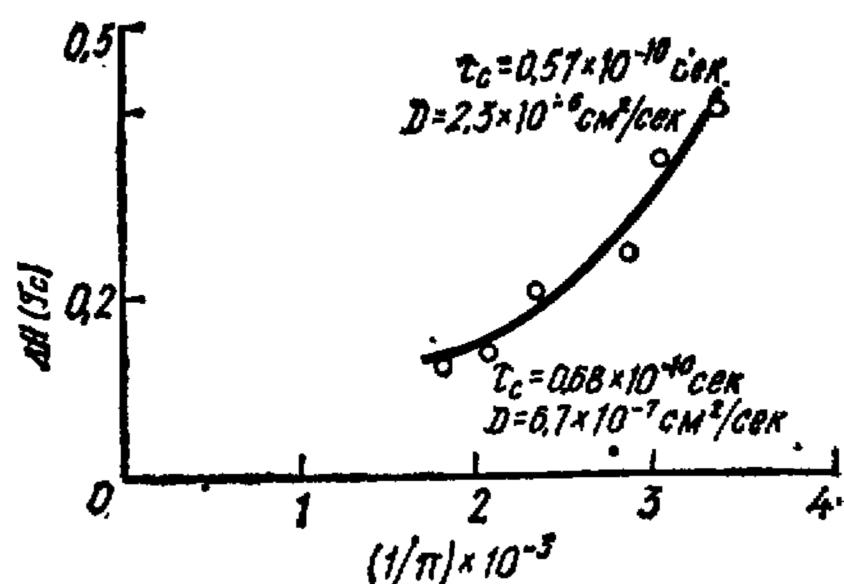
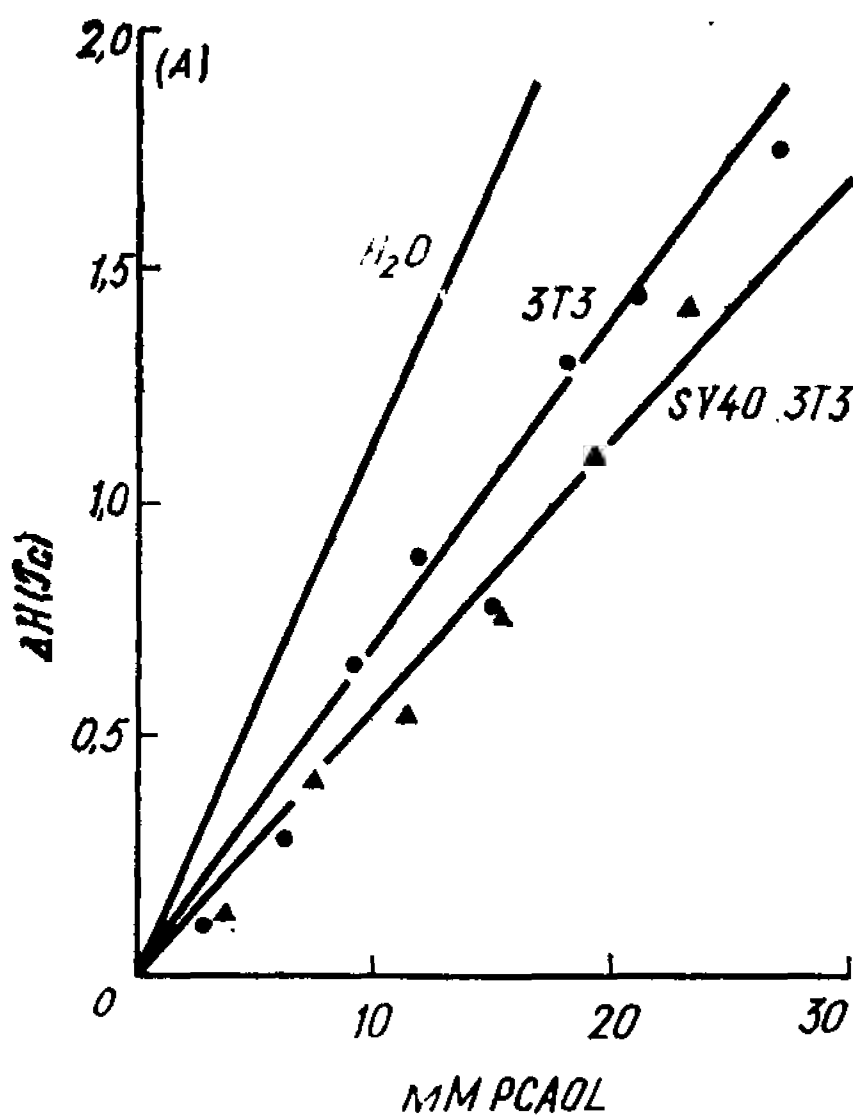


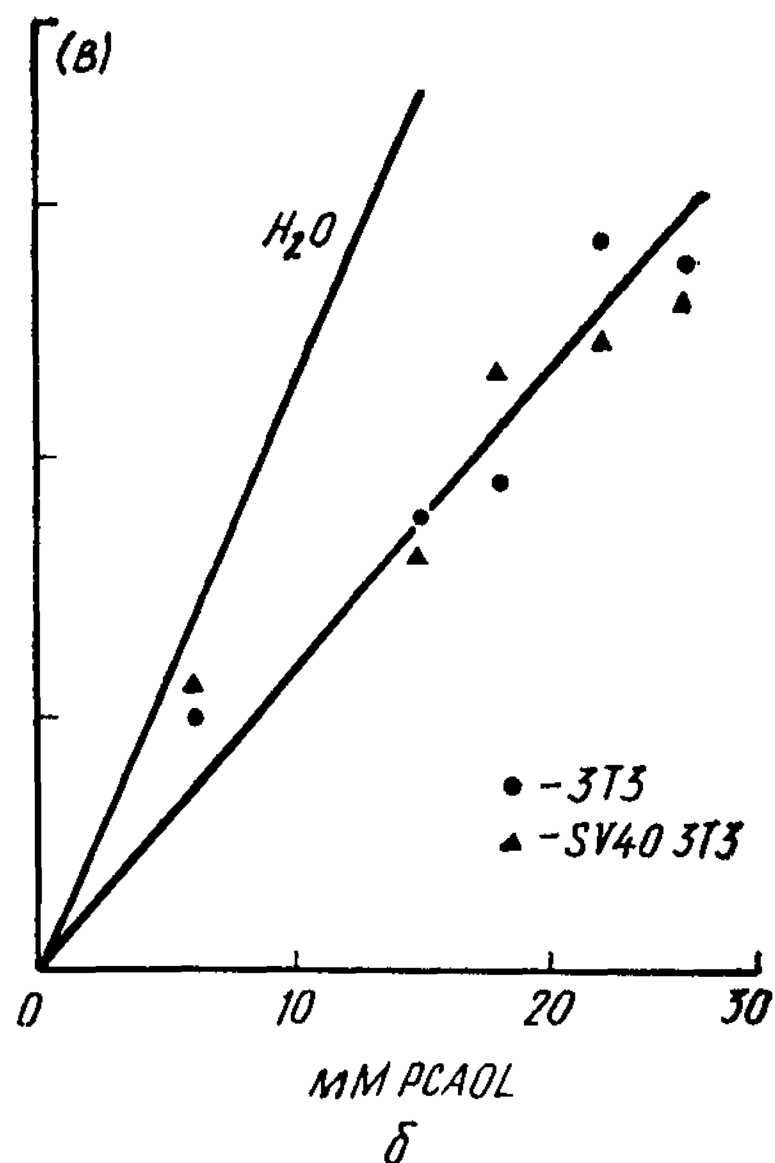
Рис. 7. Влияние осмотического давления на подвижность спин-меток в ВНК-клетках. Спин-метка TEMPONE, которая использовалась в этих экспериментах, была синтезирована из полностью дейтерированных предшественников. Эта спин-метка имела необычно малую ширину линии, что позволяло точно определять изменения ширины линии при ее концентрации в 10 мМ. Все определения D_{SL} были выполнены при концентрации метки в 10 мМ, а τ_c — при 1 мМ. Клетки суспендировали в различном количестве $NiCl_2$ в соответствии с указанными на оси абсцисс значениями гипертонических условий среды.

фологию. Мы изучили перемещение спин-меток в стимулированных сывороткой клетках 3Т3 в поздней G_1-фазе клеточного цикла. Физиологические и структурные изменения, происходящие в клетках при переходе их из состояния покоя к делению, стимулируемому сывороткой, связаны со снижением микровязкости цитоплазмы, в некоторой степени более низким по сравнению с наблюдаемым при обработке клеток цитохалазином В (рис. 6).

Изменение осмотического давления среды вызывает сморщивание или набухание клеток. В гипертонической среде также происходит модификация внутриклеточного диффузионного окружения (рис. 7). В этих условиях D_{SL} изменяется в 2 раза, а τ_c только на 18 %. Полученные данные показывают, что препятствия для диффузии становятся ближе друг к другу, так как в результате изменений осмотического давления размер клетки уменьшается.

Установлено, что клетки трансформированных линий имеют менее организованную цитоплазматическую сеть. В связи с этим мы исследовали подвижность спин-меток в трансформированных клетках и в их нормальных нетрансформированных гомологах. Мы обнаружили различия диффузионных свойств спин-меток в цитоплазме нормальных и трансформированных клеток. Было исследовано три типа нормальных 3Т3-клеток (два — мышей BALB/c и один — Swiss) и их трансформированных SV40 гомологов. Проведено сравнение диффузии спин-меток в этих нормальных и трансформированных клетках в стационарной фазе роста или спустя 12 ч после стимуляции их сывороткой. Мы полагали, что если существуют различия показателей диффузии нормальных и трансформированных клеток 3Т3, то они наиболее выражены в стационарной фазе роста. Действительно, были обнаружены некоторые различия этих показателей в клетках Swiss, 3Т3 и SV40-3Т3 (см. рис. 8, *а*). В нормальных клетках микроокружение спин-меток имело меньше ограничений, чем в трансформированных. Это показали результаты трех отдельных экспериментов. Однако в других типах нормальных и трансформированных клеток диффузионные свойства спин-меток практически не отличались (см. рис. 8, *б*). Только в третьем типе трансформированных клеток 3Т3 в одном эксперименте было обнаружено увеличение вязкости по сравнению с нормальными клетками (см. рис. 8, *в*). В повторном





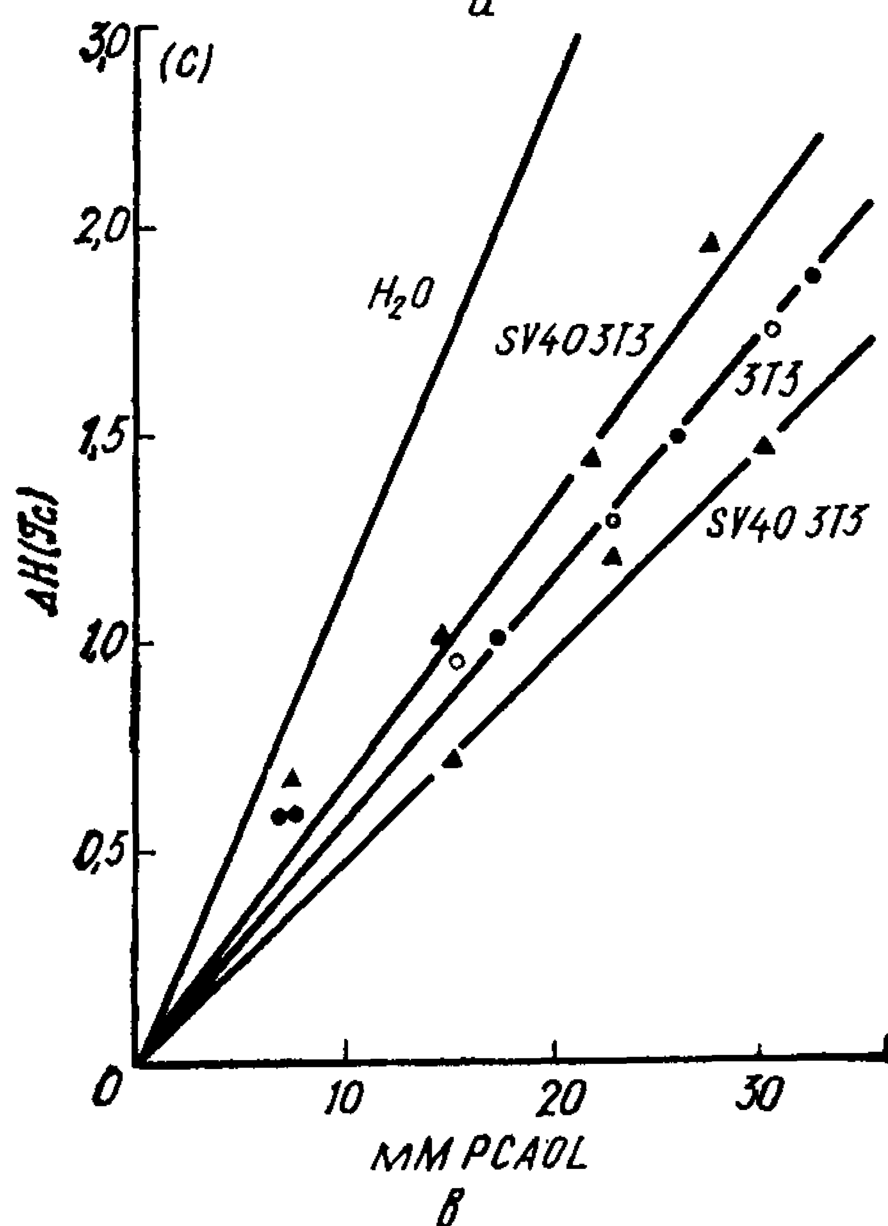


Рис. 8. Показатели исследований нормальных и трансформированных SV40 клеток 3Т3 с помощью спин-меток. Как показано, были сравнены три типа нормальных клеток 3Т3 с их трансформированными вирусами гомологами по изменениям диффузионных свойств спин-меток в цитоплазме в зависимости от их концентрации. Использовали клетки 3Т3 в стационарной фазе роста при плотности около 3—4 × 10^4/см^2. При такой же плотности брали делящиеся клетки и SV40 3Т3: *а* — Swiss 3Т3 и Swiss SV40 3Т3 были получены из лаборатории A. Mastro; *б* — BALB/c 3Т3 и SV40 получены от R. Scott; *в* — BALB/c 3Т3 и SV40 получены от P. Beall.

эксперименте было обнаружено уменьшение вязкости в цитоплазме этих клеток по сравнению с нормальными (см. рис. 8,*в*). В обоих экспериментах, проведенных с нормальными клетками, получены одинаковые значения этого показателя. Хотя можно найти несколько типов нормальных и трансформированных клеток, у которых обнаруживаются различия вязкости и диффузии спин-меток в цитоплазме, эти признаки не будут универсальными. Они скорее будут характеризовать отличие одного клона клеток от другого.

Обнаруженные нами факты поддерживают выводы Skehan и Friedman (см. гл. 2), где они указывали на то, что, возможно, состав цитоскелета клеток нормальных и трансформированных линий не очень различается. Если же существует различие, мы не будем предсказывать, что структура цитоплазмы как нормальных, так и трансформированных клеток будет оказывать одинаковое влияние на их молекулярное окружение.

10.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе изложения настоящего материала установлено, что спин-метки являются удобным инструментом для исследования физического состояния цитоплазмы. Предложена соответствующая рабочая модель для определения молекулярных параметров, которые определяют возможности диффузионных процессов. Достаточные усилия были сделаны, чтобы проиллюстрировать полезность метода. Однако ясно, что предложенная рабочая модель очень приближенно напоминает цитоплазму. Хорошо известные феномены, такие, как текучесть и тиксотропные свойства, переходы раствор — гель в некоторых клетках, демонстрируют явную сложность цитоскелета. Такие процессы должны оказывать влияние на перемещение растворенных веществ в цитоплазме.

В этой главе продемонстрировано, что увеличение диффузии в цитоплазме наступает после обработки клеток цитохолазином В. Эти результаты наводят на мысль, что потеря клеткой микрофиламентов приводит к уменьшению диффузионных барьеров. Подобные изменения вязкости цитоплазмы обнаружены при такой обработке в клетках, находящихся в состоянии покоя или роста. Обнаружено, что колцемид не оказывал заметного влияния на вязкость цитоплазмы, хотя он препятствует сборке микротрубочек.

Конечно, общая цель этой книги — выявить различия между трансформированными и нормальными делящимися клетками. С помощью метода спин-меток были обнаружены различия, однако они не способствовали решению поставленной задачи. В одних клетках трансформированных линий диффузия спин-меток была несколько снижена, в других несколько повышена. Поэтому не была обнаружена какая-либо общая закономерность изменений диффузии спин-меток в трансформированных клетках.

Эта работа частично поддерживалась Службой Исследований Военно-Морского флота (00014-79-c-0253). Мы благодарим Mr. M. Babich за помощь по включению спин-меток в клетки.

10.5. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Anisimov C. A., Nikitaev A. T., Zamaraev K. I., Molin Y. M. (1971). Separation of exhange and dipole-dipole broadening on the basis of viscosity changes in ESR spectra. Theor. Eksp. Khim. 7, 682—686.

Barnett R. E., Grisham C. M. (1972). Spin exchange of spin labeled probes in a natural membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1362—1366.

Beall P. T., Hazlewood C. F., Rao R. N. (1976). Nuclear magnetic resonance patterns of intracellular water as a function of HeLa cell cycle. Science 192, 904—907.

Berliner L. J., ed. (1976). «Spin Labeling Theory and Applications». Academic Press, New York.
Devaux P. McConnell H. M. (1972). Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers. J. Am. Chem. Soc. **94**, 4475—4481.
Devaux P., Scandella C. J., McConnell H. M. (1973). Spin-spin interactions between spin-labeled phospholipids incorporated into membranes J. Magn. Reson. 9, 474—485.
Eastman M. P., Bruno G. V., Freed J. H. (1970). ESR studies of Heisenberg spin exchange. II. Effects of radical charge and size. J. Chem. Phys. **52**, 2511—2522.
Freed J. H. (1966). On Heisenberg spin exchange in liquids. J. Chem. Phys. 45, 3452—3453.
Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., eds. (1976). «Cell Motility», Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Hammerstedt R., Amann R., Rucinsky T., Morse P., Lepock J., Snipes W., Keith A. (1976). Use of spin labels and electron spin resonance spectroscopy to characterize membranes of bovine sperm : Effect of butylated hydroxytoluene and cold shock. Biol. Reprod. **14**, 381—397.
Hammerstedt R., Keith A. D., Snipes W. Amann R., Arruda D., Griel L. C. (1978). Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality on sperm. Biol. Reprod. **18**, 686—696.
Henry S. A., Keith A. D., Snipes W. (1976). Changes in the restriction of molecular rotational diffusion of water-soluble spin labels during fatty acid starvation of yeast. Biophys. J. 16, 641—654.
Keith A. D., Snipes W. (1974). Viscosity of cellular protoplasm. Science **183**, 666—668.
Keith A. D., Pollard E. C., Snipes W., Henry S. A., Culbertson H. R. (1977a). Inositol-less death in yeast results in a simultaneous increase in cellular viscosity. Biophys. J. **17**, 205—212.
Keith A. D., Snipes W., Mehlhorn R. J., Gunter T. (1977b). Factors restricting diffusion of water-soluble spin labels. Biophys. J. **19**, 205—218.
Kivelson D., (1960). Theory of ESR linewidths of free radicals. J. Chem. Phys. **33**, 1094—1106.
Kivelson D., Collins G. (1962). 1961 Proc. Int. Conf. Magn. Reson., Ist, Jerusalem, p. 346, Wiley, New York.
Miller T. A., Adams R. N., Richards P. M. (1966). Quantitative observation of slow and fast exchange in EPR spectra of organic free radicals. J. Chem. Phys. **44**, 4022—4024.
Morse P. D., Ruhlig M., Snipes W., Keith A. D. (1975). Viscosity profile of sarcoplasmic reticular vesicles. Arch. Biochem. Biophys. **168**, 40—56.
Plachy W., Kivelson D. (1967). Spin exchange in solutions of ditertiary-butyl nitroxide. J. Chem. Phys. **47**, 3312—3318.
Pollack R., Osborn M., Weber K. (1975) Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **72**, 994—998.
Sackmann E., Trauble H. (1972a). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. I. Use of spin lavels and optical probes as indicators of the phase transition. J. Am. Chem. Soc. 94, 4482—4491.
Sackmann E., Trauble H. (1972b). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. II. Analysis of electron spin resonance spectra of steroid labels incorporated into lipid membranes. J. Chem. Soc. **94**, 4492—4498.
Salikhov K. M., Doctorov A. B., Molin Y. M. (1971). Exchange broadening of ESR lines for solutions of free radicals and transition metal complexes. J. Magn. Reson. 5, 189—205.
Scandella C. T., Devaux P., McConnel H. M. (1972). Rapid lateral diffusion of phospholipids in rabbit sarcoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **69**, 2056—2060.
Trauble H., Sackmann E. (1972). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. III. Structure of a steroid-lecithin system below and above the lipid phase transition. J. Am. Chem. Soc. **94**, 4499—1508.

11

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ pH И КОНТРОЛЬ РОСТА В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТОВ

Роберт Дж. Джиллиз

11.1. Введение 318
11.2. Физиология внутриклеточной регуляции pH 319
11.2.1. Метаболизм 319
11.2.2. Транспорт протонных эквивалентов 321
11.3. Внеклеточное pH 322
11.3.1. Внутриклеточное pH как функция внеклеточного pH 322
11.3.2. Внеклеточное pH и клеточный рост 324
11.3.3. Органические кислоты и клеточный рост 325
11.4. Клеточный цикл 326
11.4.1. Ограничительные пункты 326
11.4.2. Подциклы 327
11.4.3. Изменения внутриклеточного pH в течение клеточного цикла . . . 327
11.5. Внутриклеточное pH опухолей in situ 328
11.6. Гликолиз 330
11.6.1. Обратный пастеровский эффект 330
11.6.2. Гликолиз и рост 330
11.6.3. Внутриклеточное pH и гликолиз 333
11.6.4. Внутриклеточное pH и контроль гликолиза 334
11.7. Активация яиц морских ежей 335
11.7.1. Последовательность активации 335
11.7.2. Внутриклеточное pH и активация 336
11.7.3. Природа изменения pH 336
11.7.4. Внутриклеточное pH и Ca^{2+} во время последовательности активации 338
11.7.5. Внутриклеточное pH и метаболизм в яйцах морских ежей 338
11.8. Взаимодействие внутриклеточного pH с другими плейотропными факторами 339
11.8.1. Внутриклеточное pH и щелочные катионы 339
11.8.2. Внутриклеточное pH и дивалентные катионы 342
11.8.3. Внутриклеточное pH и циклические нуклеотиды 344
11.8.4. Внутриклеточное pH и фосфорилирование 347
11.9. Выводы 348
11.10. Указатель литературы 350

«Биологические сдвиги (внутриклеточного) кислотно-щелочного равновесия, по-видимому, таким образом коррелируют по времени с митотическим периодом и... (могут быть) непосредственно связаны с той областью энергетического обмена, которая имеет прямое отношение к митозу».

Эрик Цойтен (1914—1980)
(из : Фрайденберг и Цойтен, 1960)

11.1. ВВЕДЕНИЕ

На уровне отдельной клетки феномен трансформации проявляется в виде дилеммы: делиться или не делиться. Многие покоящиеся нормальные клетки можно стимулировать к пролиферации извне. Делящиеся нормальные клетки имеют биохимические свойства, сходные со свойствами неопластических клеток (Weinhouse, 1955; Seitz, 1965; Mannino, Burger, 1975; Pastan Johnson, 1974; Robbins, Nicholson, 1975; Watterson, 1976; Johnson, Weber, 1979). Неопластические клетки способны к пролиферации при отсутствии внешних стимулов. В этой главе будет рассмотрена роль внутриклеточного pH (pH_i) в контроле пролиферации нормальных и неопластических клеток.

Взаимосвязь внутриклеточного pH, роста клеток и метаболизма в течение многих лет была предметом размышлений. Jacques, Loeb (1913) косвенно установили наличие этой взаимосвязи после наблюдения за ролью слабых оснований в патогенезе активации яиц морских ежей. Warburg (1926) поставил этот же вопрос в 1926 г., обнаружив зависимость от pH гликолиза и гиперацидности опухолей in vivo. Fischer (1925) также высказался относительно роли pH после открытия оптимума pH среды для культивирования и клонирования клеток. Основываясь на первоначальных наблюдениях, Jacobs (1920, 1922) постулировал, что «pH среды, в которой растут клетки, не имеет никакого отношения к pH... в самой клетке».

На основании работы Jacobs были разработаны некоторые методики измерения внутриклеточного содержания слабых кислот (ДМО, CO_2) и слабых оснований (метиламина). Waddel, Butler (1959) разработали методику определения ДМО. Результаты ранних исследований pH в плане его связи с метаболизмом приведены в обзоре Hastings, Longmore (1965). Позднее Waddell, Bates (1969) представили более исчерпывающий обзор. С того времени разработаны и усовершенствованы новые, более чувствительные методики, что отражено в недавних публикациях (Gillies, Deamer, 1979; Rottenberg, 1979). Также опубликован обзор феноменологии связи внутриклеточного pH с контролем роста клеток (Gerson, 1978). Вместе с тем быстро изменяющиеся представления по этому вопросу оправдывают появление настоящего сообщения.

На последующих страницах мы будем исследовать роль внутриклеточного pH в контроле пролиферации. При анализе этой проблемы возникают следующие вопросы, ответы на которые составят содержание этой главы:

1. Регулируется ли внутриклеточное pH?

2. Каково взаимоотношение между внутриклеточным и внеклеточным pH?

3. Изменяется ли внутриклеточное pH в физиологических условиях?

4. Коррелируют ли изменения внутриклеточного pH с трансформацией?

5. Какие биохимические пути нарушаются при изменениях внутриклеточного pH?

6. Может ли изменение внутриклеточного pH привести к активации клеток?

7. Взаимодействует ли внутриклеточное pH с другими плейотропными факторами, контролирующими рост клеток?

11.2. ФИЗИОЛОГИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ pH

Как показано на рис. 1, имеется много биохимических реакций, результатом которых является чистая продукция протонного или гидроксильного эквивалента. Гомеостатическая регуляция внутриклеточного pH в клетках эукариотов сопровождается кислотной нагрузкой в результате метаболической и электрохимической диффузии протонов и транспорта протонных эквивалентов из клетки, что уменьшает кислотную нагрузку. Эти антагонистические процессы обеспечивают согласованный тонкий контроль физиологического остаточного pH клетки.

11.2.1. Метаболизм

Конечным продуктом гликолиза у анаэробных неферментирующих эукариотов являются две молекулы слабой кислоты (лактата), приходящиеся на молекулу глюкозы. В аэробных условиях из глюкозы образуется шесть молекул слабых кислот (CO_2) в результате гликолиза и реакций цикла трикарбоновых кислот. Через пентозный шунт образуется одна молекула кислоты (CO_2) на каждую молекулу глюкозы. Добавление глюкозы к клеткам в анаэробных условиях приводит к внутриклеточному подкислению (Poole, 1967; Poole et al., 1971, 1972; Thomas et al., 1979; Belt et al., 1979; den Hollander et al., 1981), а когда метаболизм глюкозы проходит в присутствии кислорода, внутриклеточное pH изменяется незначительно (Navon et al., 1977). Экзогенное применение достаточного количества лактата (Rovetto et al., 1975; Spencer, Lehninger, 1976) или бикарбоната (Thomas, 1974; Roos, 1975) приводит к внутриклеточному подкислению.

11.2.1.1. Внутриклеточное pH и CO_2

В клетках млекопитающих основным внутриклеточным буфером является буферная система CO_2/HCO_3^- с эффективным рK 6,2. Буферная способность цитоплазмы клеток эукариотов — 10—100 мЭкв H^+/единица pH/л, и вклад системы CO_2/HCO_3^- в эту буферную способность зависит от количества CO_2, присутствующего в среде (Ai-

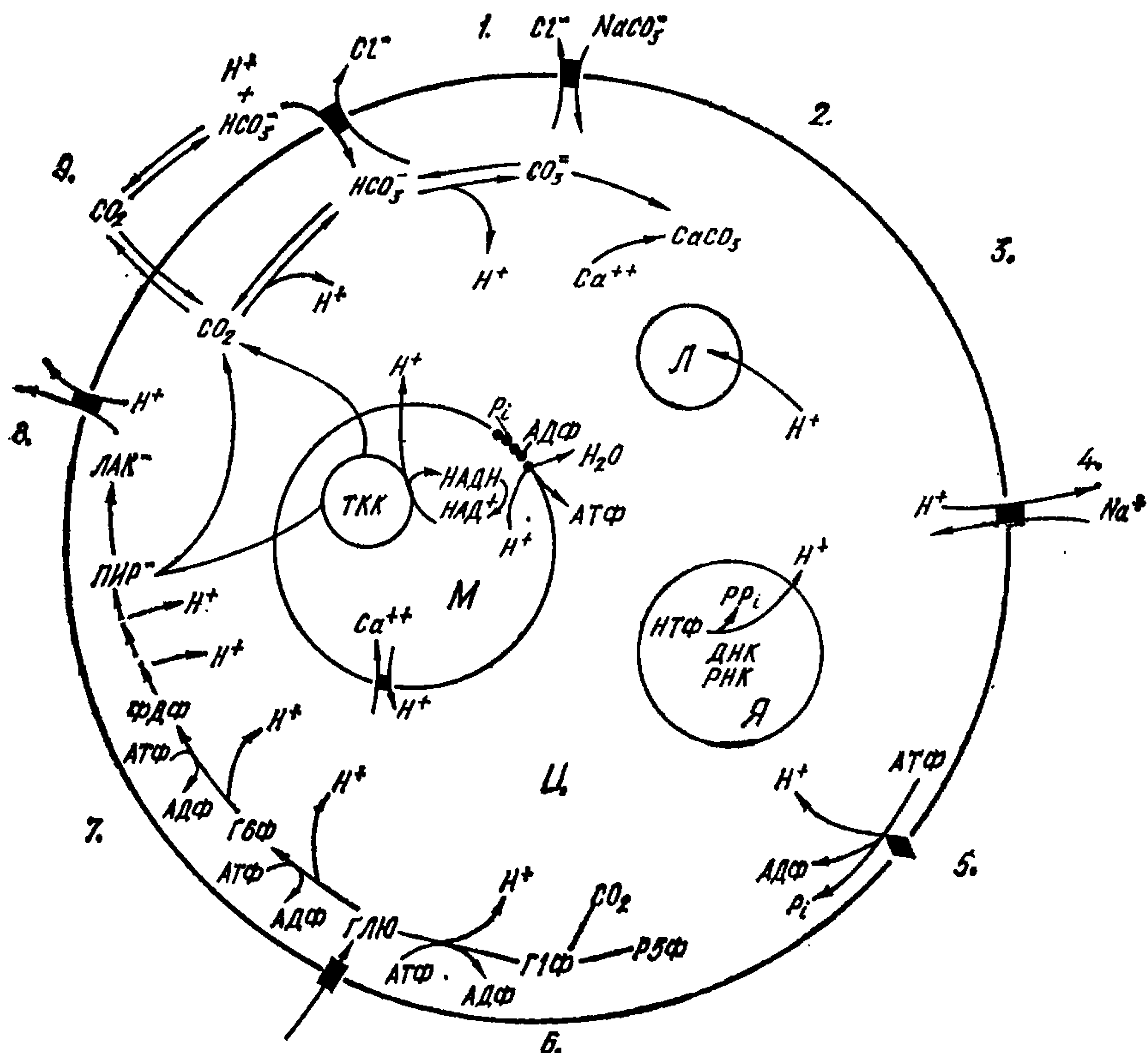


Рис. 1. Схематическое изображение реакций, проходящих с продукцией или выделением протоновых эквивалентов в клетках эукариотов: *1.* Катионный транспорт анионов (Becker e. Duhm, 1978). *2.* Образование и выделение карбоната кальция (раздел 7.4). *3.* Поглощение протона лизосомами (Jensen e. Bainton, 1973). *4.* Обмен Na^+/H^+ (раздел 2.2). Гидролиз АТФ (раздел 8.4). *6.* Пентозный шунт (раздел 2.1). *7.* Гликолиз (разделы 2.1 и 6). *8.* Транспорт молочной кислоты (раздел 2.1). *9.* Буферная система HCO_3^-/CO_2 (раздел 2.1), включая обмен Cl^-/HCO_3^- (раздел 2.2). Ц — цитоплазма, М — митохондрия, Я — ядро, Л — лизосома, ГЛЮ — глюкоза, Г6Ф — глюкозо-6-фосфат, ФДФ — фруктозо-дифосфат, ПИР — пируват, ЛАК — молочная кислота, ТКК — цикл Кребса, Р5Ф — рибозо-5-фосфат, ●●●●● транспорт электронов.

ckin, Thomas, 1975, 1977; Ellis, Thomas, 1976; Boron, DeWeer, 1976; Boron, 1977; Bolton, Vaughan-Jones, 1977). CO_2 продуцируется путем метаболического декарбоксилирования и, если не гидрирован, он диффундирует из клетки. Гидрирование CO_2 с образованием HCO_3^- и H^+ катализируется угольной ангидразой. Кроме того, содержание внутриклеточного HCO_3^- также может повышаться в результате его поглощения из среды. Буферная система CO_2/HCO_3^- постоянно изменяется под влиянием активности угольной ангидразы (Thomas, 1976; Aickin, Thomas, 1977) и циклических нуклеотидов (Fenton et al., 1978; Boron et al., 1978).

Представленные выше данные указывают на то, что метаболически продуцируемый CO_2 не влияет на внутриклеточное pH в физиологических условиях (Navon et al., 1977). Однако было обнаружено, что экзогенно применяемый CO_2 или бикарбонат вызывает внутриклеточное подкисление (Zieve et al., 1967; Ahmed, Baron, 1971; Folbergrova et al., 1972; Thomas, 1974; Aickin, Thomas, 1975; Levin et al., 1976; Boron, DeWeer, 1976; Steenbergen et al., 1977). Результаты микроэлектродных измерений показали, что клетки могут (по крайней мере частично) восстанавливать цитоплазматическое pH, нарушенное в результате использования экзогенного CO_2 (Thomas, 1974; Aickin, Thomas, 1977; Boron, DeWeer, 1976; Boron, 1977; DeWeer, 1978; Thomas, 1976). Этот феномен был впервые показан in vivo Messeter, Siesjö (1971), и его анализ привел к открытию транспортного механизма, удаляющего кислоту (см. ниже). В культуральной среде концентрация эндогенного CO_2 может повышаться до уровня, достаточного для хронического подкисления внутриклеточной среды, что приводит к остановке роста у Tetrahymena (Gillies, Deamer, 1980).

11.2.1.2. Внутриклеточное pH и молочная кислота

В отличие от CO_2 молочная кислота в основном транспортируется из клетки путем диффузии с помощью носителей, как это происходит в асцитных клетках Эрлиха (Spencer, Lehninger, 1976; Belt et al., 1979) и эритроцитах (Dubinski, Racker, 1978). В отсутствие экзогенной HCO_3^- угнетение системы транспорта лактата кверцетином предупреждает восстановление внутриклеточного pH после индуцированного глюкозой подкисления в асцитных клетках Эрлиха (Belt et al.,1979). Транспорт лактата зависит от перепада pH по обе стороны плазматической мембраны, его кинетика одинакова в обоих направлениях и, по-видимому, он сопряжен с транспортом протонных эквивалентов (Spencer, Lehninger, 1976). В асцитных клетках Эрлиха K_M носителя для лактата имеет более низкое значение по сравнению с другими однозамещенными карбоксильными кислотами, а значение V_{max} удивительно высоко — 0,6 мкмоль/мин/мг белка. Поскольку интенсивность продукции лактата анаэробными клетками Эрлиха в типичных случаях намного ниже этого значения (Belt et al., 1979), предполагается, что в физиологических условиях транспортная система не насыщается.

11.2.2. Транспорт протонных эквивалентов

Согласно уравнению Нернста клетки с отрицательным мембранным потенциалом должны иметь относительно кислую внутреннюю среду. Но внутриклеточное pH большинства исследованных клеток существенно более щелочное, чем это можно было бы предсказать по их равновесному потенциалу. Метаболические процессы обусловливают не только электрохимический вектор протонов, направленный внутрь клетки, но и внутриклеточную кислотную нагрузку. Вместе с тем щелочная реакция внутриклеточного pH предполагает

присутствие транспортных систем, противодействующих транспорту протонов и продукции кислот путем выведения кислотных эквивалентов. Как показано Thomas (1976), выведение может осуществляться посредством большого числа механизмов. До сих пор были описаны только два таких механизма, играющих роль в гомеостатической регуляции внутриклеточного pH: Na^+/H^+ (катионный) обмен и Na^+-зависимый Cl^-/HCO_3^- (анионный) обмен. Система катионного обмена блокируется амилоридом и, предположительно, опосредуется электрохимическим градиентом Na^+. Обнаружено, что она функционирует в мышце мыши (Aickin, Thomas, 1977), в нейроне речного рака и в проксимальном канальце саламандры. Кроме того, чувствительная к амилориду экструзия кислот наблюдалась также в яйцах морских ежей (Johnson et al., 1976), хотя до сих пор точная природа этой транспортной системы остается невыясненной (см. гл. 7). Анионный обмен подавляется блокаторами натриевых или анионных канальцев, такими, как СИТС (4-ацетамидо-4¹-изотиоцианостильбен-2,2¹-дисульфонат), ДИДС (4,4¹-диизотиоцианостильбен-2,2¹-дисульфонат) или фуросемид (Boron et al., 1976). Установлено, что Na^+-зависимый обмен Cl^-/HCO_3^- функционирует в гигантском аксоне кальмара (Boron, DeWeer, 1976; Russel Boron, 1976), нейронах улитки (Thomas, 1977) и в мышце усоногого рака (Boron, 1977). Анионный обмен требует АТФ и стимулируется присутствием цАМФ (Boron, DeWeer, 1976). В дополнение к катионному обмену в мышце мыши существует Na^+-независимый анионный обмен (Aickin, Thomas, 1977). Возможно, дальнейшие исследования покажут, что наличие в пределах одной мембраны анионного и катионного обменов — универсальный феномен. Более полный обзор сведений по этим обменным механизмам и их роли в регуляции внутриклеточного pH в настоящее время находится в стадии подготовки (Roos, Boron, 1981).

11.3. ВНЕКЛЕТОЧНОЕ pH

11.3.1. Внутриклеточное pH как функция внеклеточного pH

Способность клеток эукариотов поддерживать относительно постоянное внутриклеточное pH при широко варьирующем pH окружающей среды (pH_e) в разных системах различна (рис. 2). Tetrahymena — свободно живущее простейшее, внутриклеточное pH которого составляет 7,15 ± 0,05, в то время как pH окружающей его среды варьирует в диапазоне значений 5,75—7,40 (Gillies, Deamer, 1979). Установлено, что энергизированная Saccharomyces cerevisiae также поддерживает постоянное внутриклеточное pH при широком диапазоне его значений для внешней среды (Navon et al., 1979; den Hollander et al., 1981). Клетки млекопитающих поддерживают постоянное pH_i не при таком широком диапазоне pH_e, хотя некоторые типы проявляют удивительные способности контроля. Внутриклеточное pH эритроцитов человека в растворе Рингера линейно зависит от внеклеточного pH и, как было обнаружено, поддерживается равнове-

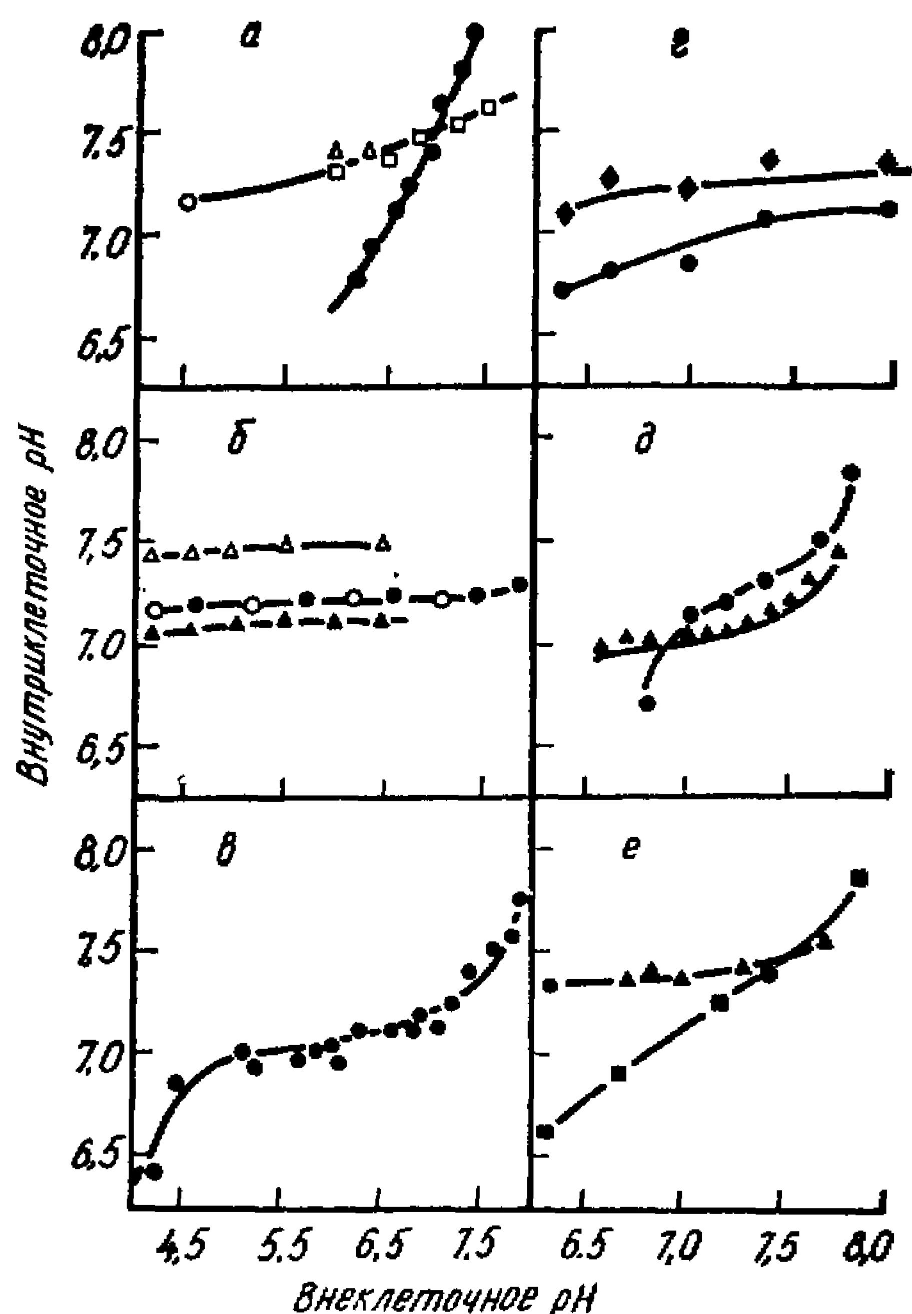


Рис. 2. Внутриклеточное pH как функция внеклеточного pH для шести типов клеток (метод определения указан в скобках после каждой ссылки): *а* — E. coli, все измерения проводились в присутствии глюкозы, незаштрихованные символы представляют измерения, проведенные в аэробных условиях, заштрихованные — при анаэробных. (○) Garcia-Sancho, Sanchez, 1979 (сиаловая кислота), (□) Navon et al., 1977 (ЯМР), (△) Ungurbil et al., 1979 (ЯМР), (●) Ugurbil et al., 1978 (ЯМР); *б* — Saccharomyces cerevisiae, все измерения проводились в присутствии глюкозы, незаштрихованные символы представляют аэробные условия, заштрихованные — анаэробные (▲, △) — рост в ацетате (дерепрессия), (●, ○) — рост в глюкозе (репрессия), den Hollander et al., 1981 (ЯМР); *в* — Tetrahymena pyriformis (штаммы GL и DN_3), определение лог-фазы клеток в присутствии полной ростовой среды. Gillies, Deamer, 1979 (ДМО); *г* — мышца усоногого рака, измерения проводились в искусственной морской воде, содержащей (◆) фосфатный буфер или (●) бикарбонатный буфер, Bittar et al., 1977 (ДМО); *д* — лейкоцит человека, измерения при изменяющихся условиях pCO_2 и HCO_3^- (физиологический диапазон — 5—8 мм pCO_2 и 25 мМ HCO_3^-), (▲) 5—8 мм pCO_2 и 25—50 мМ HCO_3^-, Levin et al., 1976 (ДМО), (●) 40 мм pCO_2 и 25 мМ HCO_3^-, Zieve et al., 1967 (ДМО); *е* — клетки асцитного рака Эрлиха, измерения проводились в присутствии или в отсутствие молочной кислоты, (■) в присутствии 10 мМ молочной кислоты, Spencer, Lehninger, 1976 (ДМО), (▲) в отсутствие экзогенного лактата, Poole, 1967 (ДМО), (●) Thomas et al., 1979 (ДМО).

сием Доннана (Battaglia et al., 1965; Scarpa et al., 1970). Если изменять наружное pH путем изменения концентрации ионов CO_2 или HCO_3^-, лимфоциты также не поддерживают постоянное внутриклеточное pH (Zieve et al., 1967). Однако при низких значениях напряжения CO_2 ($pCO_2 < 20$ мм рт. ст.) лейкоциты поддерживают внутриклеточное pH 7,05 ± 0,05 при изменении наружного pH в диапазоне значений от 6,7 до 7,4 (Levin et al., 1976). Сердечная мышца млекопитающих также поддерживает pH_i 7,05 ± 0,05 против pH_e, варьирующего от 6,6 до 7,3 в буфере без бикарбоната (Steenbergen et al., 1977). В безбикарбонатном буфере асцитные клетки Эрлиха имеют внутриклеточное pH 7,4 ± 0,2 при наружном pH_i, варьирующем от 6,2 до 8,0 (Poole et al., 1972; Spencer, Lehninger, 1976; Belt et al., 1979). Однако они утрачивают способность поддерживать постоянное pH_i в присутствии 5—10 мМ лактата. Navon и соавт. (1977) исследовали внутриклеточное pH и гликолиз в асцитных клетках Эрлиха с использованием ядерного магнитного резонанса ^{31}P (ЯМР — ^{31}P).

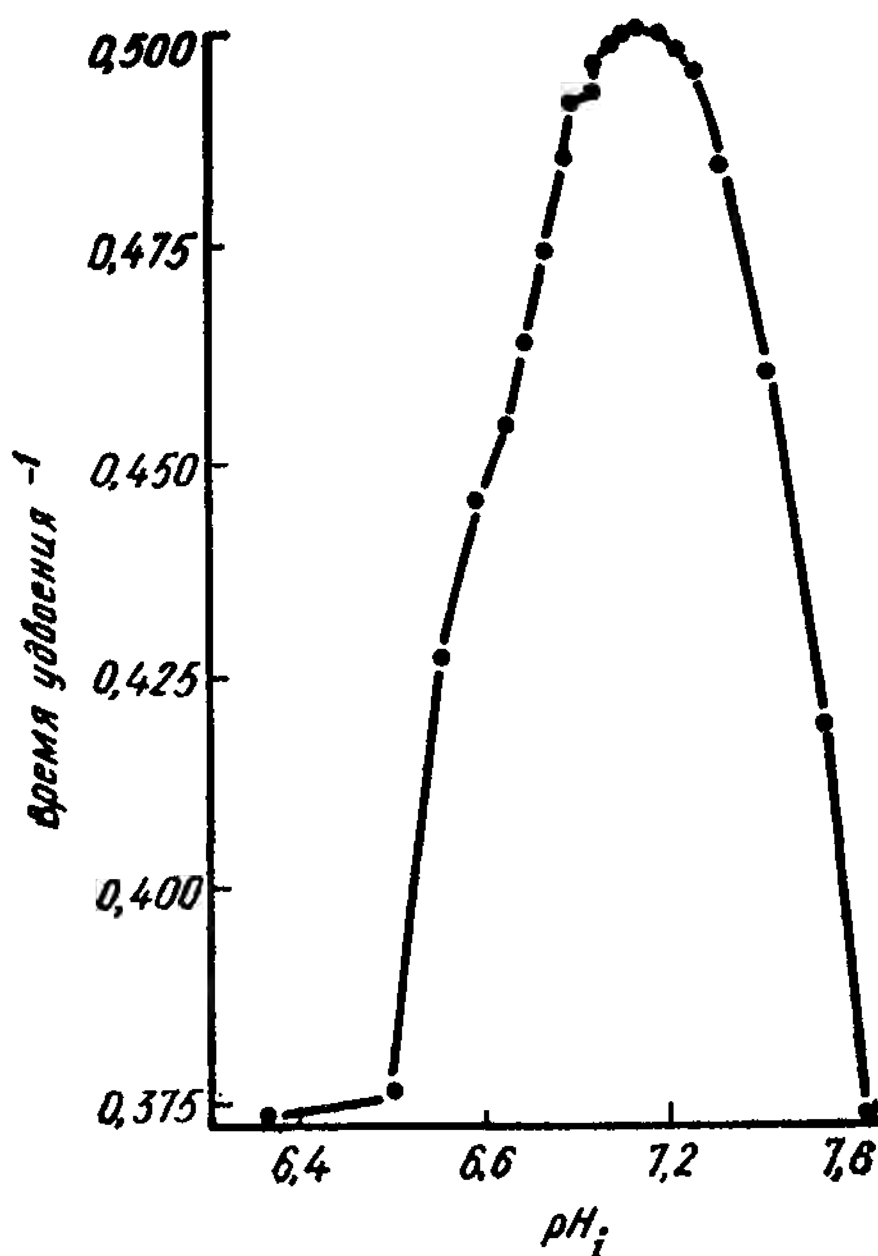
Они обнаружили, что при отсутствии глюкозы различие между pH_i и pH_e (ΔpH) в одну единицу исчезает в течение 1 ч. В присутствии глюкозы и в отсутствие кислорода или экзогенного бикарбоната ΔpH также не поддерживается. Это согласуется с описанными выше результатами, полученными после добавления лактата. Аэробный гликолиз также приводит к понижению pH_i и pH_e более чем на полторы единицы pH в течение 1 ч. Добавление глюкозы в присутствии кислорода не изменяет ни pH_i, ни pH_e — оба эти значения в данном опыте составляли 7,2.

Ясно, что способность клеток поддерживать внутриклеточное pH на постоянном уровне при варьирующем наружном pH может зависеть от концентрации в среде слабых кислот. При достаточной концентрации эти кислоты поступают в клетки pH-зависимым способом, перегружают кислотовыводящую систему и вызывают внутриклеточное подкисление (Roos, 1975). Во всех описанных выше системах способность клеток поддерживать постоянное значение внутриклеточного pH резко уменьшается при щелочном наружном pH. Кислое наружное pH имеет меньший эффект, что согласуется с известной способностью клеток преодолевать кислотные нагрузки (см. предыдущий раздел). Кроме того, возможно, имеет значение наблюдение, что асцитные опухолевые клетки поддерживают более щелочное pH_i при большем диапазоне наружного pH, чем нормальные клетки, хотя это было обнаружено только в одной системе. Проведение дальнейших исследований физиологического диапазона внутриклеточного pH в неопластических клетках по сравнению с нормальными, несомненно, необходимо.

11.3.2. Внеклеточное pH и клеточный рост

В течение уже многих лет известно, что экстраклеточное pH влияет на рост клеток (Fischer, 1925). Работами Mackenzie и сотрудников (1961), Ceccarini и Eagle (1971), Rubin (1971) определены оптимумы внеклеточного pH роста различных типов клеток. Результаты исследований показали, что, размножаясь при оптимуме pH, нормальные клетки могут достичь такой же высокой плотности роста, как и их неопластические гомологи. Кроме того, клеточный рост тормозится резко в щелочной области значений оптимума pH и более постепенно — в кислой, что согласуется с взаимоотношением внутри- и внеклеточного pH, описанным в предыдущем разделе. Результаты дальнейших наблюдений показали, что неопластические клетки обычно имеют более кислый оптимум pH роста и менее чувствительны к изменениям pH окружающей среды, чем их нормальные гомологи (Eagle, 1973). Было установлено, что внеклеточное pH также сильно влияет на многие другие клеточные функции, такие, как клонабельность (Fischer, 1925; Eagle, 1973), дифференцировка (Carter, Nijhout, 1977), синтез специфических белков (Pfeiffer, Eagle, 1976; McKenzie et al., 1961; Nigra et al., 1973), сборка белков in vitro (Begg, Rebhun, 1979; DeWit, Schaafsma, 1978), синтез вируса (Fields, Eagle, 1973) и его спасение (Calothy et al., 1973). У Tetrahymena скорость

Рис. 3. Скорость роста и внутриклеточное pH у Tetrahymena pyriformis. Интенсивность роста и pH_i изменялись путем варьирования внеклеточного pH в отдельных опытах. Graph указывает на корреляцию параметров и не склонен объяснять это случайностью. Интенсивность роста выражена как величина, обратная удвоению времени в часах. Внутриклеточное pH определялось с использованием ДМО в лог-фазе роста клеток в полной ростовой среде.



роста максимальна в диапазоне значений pH от 5,75 до 7,40. Как ранее упоминалось, внутриклеточное pH относительно постоянно при изменении наружного pH в том же самом диапазоне. На графике зависимости скорости роста клеток от внутриклеточного pH показан достаточно отчетливый оптимум внутриклеточного pH роста клеток (рис. 3). Однако до сих пор не ясно, определяется ли скорость роста внутриклеточным pH или же pH_i поддерживается как постоянная величина в связи с оптимальными условиями роста. Необходимо дальнейшее исследование этого феномена в данной и других системах.

11.3.3. Органические кислоты и клеточный рост

Как указывалось ранее, клетки многих типов способны поддерживать внутриклеточное pH в пределах строгих границ при относительно широком диапазоне значений наружного pH. Способность поддерживать pH_i существенно зависит от концентрации органических кислот (лактата) и углекислоты в среде. Эти кислоты являются конечными продуктами метаболизма и их концентрация в среде повышается с возрастом культуры (Eagle, 1971, 1973; Gillies, Deamer, 1980). Учитывая это, можно предсказать, что в суспензионных культурах рост клеток должен меньше зависеть от изменений pH окружающей среды, чем в плотных культурах. Rubin (1971) наблюдал этот феномен в куриных эмбриональных фибробластах и обнаружил, что фибробласты, трансформированные вирусом SV40, имеют промежуточную чувствительность к изменениям pH_e по сравнению с суспензионными и плотными культурами. Этому феномену можно дать много объяснений. Для более полной оценки механизмов влияния внеклеточного pH на рост клеток необходимо более детальное исследование взаимосвязи внутри- и внеклеточного pH, содержания органических кислот и роста.

В сотрудничестве с D. W. Deamer мы исследовали этот вопрос с использованием Tetrahymena — реснитчатого простейшего с быстрым ростом и хорошо описанными свойствами, качественно подобными свойствам клеток млекопитающих (Hill, 1972; Elliot, 1973; Stein, Blum, 1979). В более ранних исследованиях мы установили, что pH_i поддерживается на постоянном уровне при pH_e, изменяющемся в диапазоне, оптимальном для роста клеток (Gillies, Deamer, 1979). Недавно мы отметили, что концентрация HCO_3^- в среде повышается по мере роста культуры (Gillies, Deamer, 1980). Даже при постоянном встряхивании содержание HCO_3^- повышается до постоянной концентрации — 25 мМ, что сопровождается переходом в стационарную фазу. Поскольку в начале стационарной фазы источник пищи не истощается, о чем свидетельствует продолжающаяся продукция NH_3, мы исследовали, достаточно ли добавления 25 мМ CO_2 для перегрузки системы, регулирующей pH, и остановки роста. Для тестирования культуру обрабатывали нелетучей слабой кислотой 5,5-диметилоксазолидин-2,4-дион (ДМО) и обнаружили аналогичную концентрацию и pH-зависимость остановки клеточного роста и удаления градиента pH. Использование DMO в качестве нелетучего аналога CO_2 подкрепляется также наблюдениями Roos (1975). Дальнейшая обработка, уменьшающая содержание CO_2 в среде растущих культур, приводила к шестикратному увеличению плотности роста культур, находящихся в стационарной фазе. Результаты показывают, что у Tetrahymena высокие концентрации метаболически образующихся слабых кислот могут привести к независимости роста клеток от pH. Проявление этого феномена в клетках других типов пока еще не исследовалось.

11.4. КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ

11.4.1. Ограничительные пункты

Вопросы контроля клеточного роста и неоплазии неразрывно связаны с клеточным циклом (Klevecz, Forest, 1977). По классификации, разработанной Howard и Pelc (1952), клеточный цикл у эукариотов разделен на четыре фазы: M (для митоза), S (для синтеза ДНК) и две промежуточные фазы (G_1 и G_2), отделяющие фазы S и M. Фаза G_1 наступает между концом митоза и началом синтеза ДНК. Она наиболее вариабельна по времени и, согласно Mueller (1971), это — фаза, в которой наиболее выражены фенотипические признаки клетки. В течение цикла деления клетка проходит ряд критических ступеней, в которых может произойти остановка роста. Одна из основных ступеней появляется в G_1-фазе: известно, что при этом клетка чувствительна к голоданию, лишению сыворотки и сниженному pH окружающей среды (Prescott, 1976). Эта ступень называется точкой R (restriction) и, если клетка ее не проходит, начинается вегетативный рост (Pardee, 1974). Вегетативные клетки не имеют клеточного цикла и их состояние обычно называют фазой G_0 (Lajtha, 1963). Если клет-

ки прошли точку R, в них происходит репликация ДНК и в большинстве случаев они коммитируются к делению (Sisken et al., 1965). Быстро пролиферирующие клетки не встречают препятствий при прохождении через клеточный цикл и их биохимические свойства сходны независимо от того, нормальны ли они или неопластически по своей природе (Mueller, 1971; Burger, 1973; Seitz, 1965; Robbins, Nicholson, 1975; Weinhouse, 1955; Pastan, Johnson, 1974; Johnson, Weber, 1979; Watterson et al., 1976; Mannino, Burger, 1975). Несомненно, понимание физиологической природы точки R имеет важнейшее значение для изучения контроля клеточного роста.

11.4.2. Подциклы

Понятия о клеточном цикле в последние годы изменились. Hartwell и сотрудники (Hartwell, 1971; Hartwell et al., 1970, 1973, 1974) установили присутствие двух подциклов в каждом клеточном делении дрожжевого грибка. Один подцикл представляет собой «ядерные» процессы, такие, как репликация ДНК, деление ядра и ядерная миграция. Другой — включает «цитоплазматические» процессы, такие, как появление почки и ее рост. Когда ядро мигрирует в почку соответствующего размера, возникает цитогенез, и в это время подциклы соединяются. После деления циклы снова разделяются в точке, обозначаемой «старт», которая несколько подобна точке R. Разделившись, подциклы проходят независимо один от другого. Остановка одного подцикла не нарушает развития другого, и наоборот. Присутствие раздельных ядерных и цитоплазматических подциклов также наблюдалось у Tetrahymena (Zeuthen, 1978).

11.4.3. Изменения внутриклеточного pH в течение клеточного цикла

В 1960 г. Frydenberger, Zeuthen (1960) наблюдали дыхательные циклы в дробящихся яйцах Urechis campo и Dendraster exentricus. На основании результатов наблюдений они предсказали, что внутриклеточное pH, по-видимому, варьирует в течение клеточного цикла, причем минимальные значения отмечены непосредственно перед цитокинезом или синтезом ДНК. Они определяли эти минимальные значения по повышенной продукции кислот в эти периоды, и их предсказания удивительно точно согласуются с последующими наблюдениями.

Gerson и Burton (1976) обнаружили у Physarum polycephalum один щелочный сдвиг внутриклеточного pH, возникающий перед митозом. Восстановление после щелочной перегрузки происходит путем повышенного метаболизма (см. раздел 6), что согласуется с наблюдениями Frydenberg Zeuthen (1960). Physorum — синцитиальный слизистый гриб, в котором митоз проходит без цитокинеза. В этой системе сдвиг pH составляет примерно 0,6 единицы pH по сравнению с основным уровнем — примерно 5,8 единицы. Поскольку в этих клетках практически отсутствует фаза G_1, синтез ДНК начи-

нается сразу же после митоза. Неясно, коррелирует ли сдвиг pH с ядерным или цитоплазматическим подциклом в этой системе.

В синхронизированных Tetrahymena наблюдается два щелочных сдвига внутриклеточного pH в течение одного клеточного цикла. Tetrahymena pyriformis GL — реснитчатое простейшее, размножающееся путем амитоза. Изменения pH можно наблюдать при использовании двух различных методик синхронизации, и размах колебаний составляет 0,3—0,4 единицы pH по сравнению с базальным уровнем внутриклеточного pH 7,2 (Gillies, Deamer, 1979). При использовании метода синхронизации путем теплового шока, разработанного Zeuthen (1971), деление клеток в культуре синхронизируется на 90—95 %, и фаза G_1 практически отсутствует. В этих условиях сдвиг pH возникает непосредственно до и после цитокинеза и синтеза ДНК. Кинетика клеточного цикла при синхронизации путем голодания и питания отличается от таковой при синхронизации, полученной с помощью теплового шока (Cameron, Jeter, 1970). При использовании этого метода синхронность синтеза ДНК примерно такая же, как при использовании методики теплового шока. Однако синхронность цитокинеза явно понижена, и этот процесс запаздывает по сравнению с синтезом ДНК на несколько часов. Сдвиги pH в культурах, синхронизированных путем голодания — питания и теплового шока, удивительно сходны как по величине, так и по временно́й связи с синтезом ДНК. На сдвиги pH не влияют время, продолжительность или степень цитокинеза. Мы пришли к заключению, что щелочной сдвиг pH ассоциирован с ядерным подциклом, а не с цитоплазматическим.

Учитывая биологические различия между Physarum polycephalum и Tetrahymena pyriformis, такое высокое сходство данных, полученных в обеих системах, удивляет. Как упоминалось выше, один тип клеток делится митотически без цитокинеза, другой — имеет цитокинез, но не делится митотически. Это наблюдение также подкрепляет вывод о том, что сдвиги pH каким-то образом связаны с синтезом ДНК, а не с цитокинезом или митозом. Интересно отметить, что, по крайней мере, у Physarum скорость продукции лактата повышается сопряженно с повышением внутриклеточного pH. Это согласуется с влиянием pH на гликолиз (см. раздел 7) и может объяснять механизм восстановления клетки после щелочной нагрузки. Нет данных, свидетельствующих о значении сдвигов pH, хотя на этот счет имеется много предположений.

11.5. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ pH ОПУХОЛЕЙ IN SITU

Имеется много согласующихся данных, свидетельствующих о том, что значение экстраклеточного pH опухолей in situ несколько ниже значения pH окружающих нормальных тканей (Kahler, Robertson, 1943; Naesland, 1955; Eden et al., 1955). Вместе с тем установлено, что значение внутриклеточного pH клеток опухолей in situ близко к значениям,— или, в крайнем случае, несколько выше,— pH клеток окружающих тканей (Poole et al., 1972; Schloerb et al., 1965; Poole, 1967). Интересны результаты, показывающие, что pH опухолей, если

исследуемая ткань не васкуляризирована, более кислое (Meyer et al., 1948) и бессосудистые опухоли находятся в латентном состоянии (Folkman, 1974). Как обнаружено при использовании перфузируемого сердца, васкуляризация позволяет клеткам поддерживать более щелочное внутриклеточное pH, по-видимому, вследствие того, что облегчается диффузия метаболически продуцируемых кислот из системы (Rovetto et al.,1975; Neely et al., 1975; Steenbergen et al.,1977). Kitagawa и Kuroiwa (1976) исследовали pH клеток печени in vivo при канцерогенезе, индуцированном азосоединениями. Они сообщили, что внутри- и внеклеточное pH печени крыс, которым скармливался 3'-метил-4-диметиламиноазобензол (3'-Ме-ДАБ), значительно снижалось по сравнению с печенью крыс, которым скармливали 2-Ме-ДАБ — неканцерогенный азокраситель. В этой работе не отмечалась корреляция между низким pH_i и содержанием тканевого лактата. После вскармливания животных 3'-Ме-ДАБ в течение 15 нед. pH_i повышалось до значений, более щелочных, чем в контроле, что сопровождалось необратимым формированием опухоли. В этой работе было сделано интересное наблюдение, что pH_i клеток опухолевых узлов никогда не отличалось от pH_i гепатоцитов в той же печени.

Результаты исследований pH клеток опухолей in situ хорошо совпадают с данными, полученными in vitro. Асцитные клетки Эрлиха способны поддерживать более щелочное внутриклеточное pH при широком диапазоне экстраклеточного pH, чем нормальные клетки (см. рис. 2). Способность поддерживать щелочное внутриклеточное pH уменьшается при добавлении извне лактата, что аналогично ситуации, имеющей место в неваскуляризированной ткани. В повышенной интенсивности гликолиза клеток опухолей in situ может играть роль более щелочное внутриклеточное pH (Warburg, 1926). Повышенная интенсивность гликолиза — предполагаемая причина наблюдающегося кислого экстраклеточного pH в опухолях. Наблюдение, что опухолевые клетки имеют более щелочное экстраклеточное pH, может быть важным в связи с имеющимися данными о щелочных значениях оптимума внутриклеточного pH для метаболизма некоторых систем (Minakami, 1975; Belt et al., 1979) и их роста (Gillies, Deamer, 1979, 1980).

Каким образом опухолевые клетки способны поддерживать оптимальные для роста значения pH, если принять во внимание их интенсивный метаболизм и кислое pH окружающей среды? Нормальным последствием повышенного обмена в нормальных и трансформированных клетках и повышенного содержания лактата или CO_2 в среде является внутриклеточное подкисление. Кислое pH_i подавляет гликолиз, синтез белков и рост. Таким образом, по-видимому, клетки опухолей in situ имеют некоторый механизм, с помощью которого они избегают метаболическое внутриклеточное подкисление и который, вероятно, связан с васкуляризацией. Возможно, что системы, регулирующие pH в опухолевых клетках, способны более эффективно выводить протонные эквиваленты, хотя это предположение еще нуждается в проверке.

11.6. ГЛИКОЛИЗ

11.6.1. Обратный пастеровский эффект

Различия интенсивности гликолиза в нормальных и опухолевых клетках было давно показано Warburg (1926) и сейчас остается одним из наиболее выдающихся свойств опухолевой клетки. В обзоре, написанном в конце его карьеры, Warburg (1956) предложил рассмотреть идею о том, что этиология канцерогенеза включает вначале необратимое повреждение дыхательной функции клетки, которая затем погибает или адаптируется путем повышения способности к анаэробному обмену. Данные, полученные позднее, не смогли подкрепить гипотезу Warburg (Wenner, 1975). Однако не вызывает сомнения, что в трансформированных клетках in vivo и in vitro обмен сахаров более интенсивен, чем в их нормальных аналогах (Demetrakopoulos et al., 1978).

Как обнаружено Aisenberg (1961), большинство опухолевых клеток имеет повышенную интенсивность анаэробного и аэробного гликолиза по сравнению с нормальными клетками. Пастеровский эффект постулирует, что в активно дышащих клетках гликолиз должен подавляться (Pasteur, 1876). Другими словами, пастеровский эффект представляет собой уменьшение метаболической продукции кислот, причиной которого является перенос клеток из азотного окружения (анаэробного) в кислородное (аэробное). Как показано в табл. 1, в опухолевых клетках наблюдается нормальный пастеровский эффект, если учитываются абсолютные значения, но на процентной основе можно видеть, что гликолиз гораздо меньше угнетается при дыхании в опухолевых клетках, чем в нормальных (см. Weinhouse, 1955). Проявление пастеровского эффекта в трансформированных клетках остается спорным вопросом. Вместе с тем известно, что трансформированные клетки обычно производят некоторое количество энергии в результате гликолиза даже в присутствии кислорода. Повышенный уровень аэробного гликолиза в трансформированных клетках обозначается как эффект Варбурга (Wenner, 1975). Лучшее понимание механизмов, вовлеченных в пастеровский эффект, покажет, каким образом трансформированная клетка способна к гликолизу в аэробных условиях — свойству, которое может оказаться необходимым для клеточной пролиферации.

11.6.2. Гликолиз и рост

Burk и сотрудники (1967) обнаружили серии клеток саркомы Иенсена, по характеру анаэробного и аэробного гликолиза сходные с пролиферирующими нормальными клетками. Анализ этих данных показывает очень сильную корреляцию скорости роста и интенсивности гликолиза. Подобный феномен наблюдается также в клетках гепатомы Морриса (Morris, 1965, Weinhouse, 1970) и нормальных клетках (Wenner, 1975). Случайна ли корреляция интенсивности гликолиза со скоростью роста или же она представляет собой важное звено трансформационного события? Другими словами, необходим ли гликолиз

Таблица 1. **Пастеровский эффект в нормальных и трансформированных клетках** [1]

Физиологическое состояние клеток, их тип	Продукция лактата		Пастеровский эффект		Авторы
	Аэробные условия	Анаэробные условия	абсолютный	относительный (%)	
Трансформированные					
Саркома Рауса	20	30	10	33	Warburg (1925)
Саркома 37	12	28	16	57	Crabtree (1929)
Карцинома 113	5	14	9	64	Crabtree (1929)
Меланома 91	3	12	9	75	Burk et al. (1941)
Асцит Эрлиха	30	70	40	57	Warburg (1956)
Саркома Йенсена	16	34	18	53	Warburg (1926)
Саркома Уолкера 256	24	42	18	43	Dickins (1936)
Карцинома кожи	15	19	4	21	Warburg et al. (1924)
Смешанная саркома	6	12	6	50	Lasnitzki (1928)
Среднее	14,6	29,0	14,4	50,3	
Стандартная ошибка	3,0	6,2	3,6	5,4	
Нормальные					
Печень крыс	0,7	3,0	2,3	77	Warburg et al. (1924)
Костный мозг кролика	3	21	18	86	Fujita (1928)
Фибробласты цыплят	5	23	18	78	Warburg Kubowitz (1927)
Мозг крыс	3	19	17	89	Warburg et al. (1924)
Куриный эмбрион	1	21	20	95	Warburg et al. (1924)
Гладкая мышца кошки	0,4	6,1	5,7	93	Rosenfeld, Lasnitzki (1928)
Миндалина человека	3	13	9	69	Warburg et al. (1924)
Селезенка крысы	0	9	9	100	Fujita (1928)
Лейкоциты крысы	2	20	18	90	Fujita (1928)
Среднее	2,0	15,0	13,0	86,3	
Стандартная ошибка	0,5	2,5	2,2	3,3	
Значение	$<0{,}005$	$<0{,}005$	НЗ	$<0{,}005$	

Примечание. [1] Продукция молочной кислоты определялась манометрически и выражалась в микролитрах газа, выделяющегося из бикарбонатного буфера и приходящегося на миллиграмм сухой массы ткани за час. Абсолютный пастеровский эффект — разница между аэробными и анаэробными условиями. Относительный эффект — процентное снижение продукции кислоты между анаэробными и аэробными условиями. Значение определялось по тесту t Стьюдента при сравнении трансформированных и нормальных популяций. НЗ — незначительно.

вообще или он достаточен только для беспрепятственного прохождения клетки через клеточный цикл? Без стимуляции лимфоциты периферической крови в течение длительного периода существуют в вегетативном состоянии (G_0) (Fitzgerald, 1964; Epstein, Stohlman, 1964). Добавление какого-либо митогена или антигена стимулирует их пролиферацию (Oppenheim, 1968). Стимуляция пролиферации лимфоцитов — ценная система исследования контроля клеточного роста. Одним из самых ранних процессов, возникающих после обработки лимфоцитов ФГА, является резкое повышение интенсивности аэробного гликолиза с последующим (через несколько часов) началом синтеза ДНК и белков (MacHaffie, Wang, 1967; Pachman, 1967; Polgar et al., 1968). Результаты исследований показывают, что для индуцированной митогеном пролиферации лимфоцитов необходима повышенная интенсивность гликолиза.

Подобный феномен также наблюдается на фибробластах. Лишение сыворотки приводит к прекращению роста мышиных фибробластов 3Т3, но не клеток 3Т3, трансформированных вирусом SV40, или спонтанно трансформированных клеток 3Т6 (Romano, Colby, 1973). Добавление сыворотки к нормальным клеткам стимулирует их пролиферацию. При изучении контроля роста система фибробластов аналогична системе лимфоцитов в том отношении, что оба вида клеток могут быть переведены из фазы G_0 в пролиферативное состояние путем добавления факторов извне. После добавления сыворотки к нормальным клеткам 3Т3 один из первых процессов — повышенная интенсивность потребления глюкозы (Colby, Romano, 1975; Weber, 1973). И в этой системе угнетение гликолиза 2-дезоксиглюкозой предупреждает стимуляцию роста. В трансформированных клетках гликолиз проходит активно даже в отсутствие сыворотки (Hassell et al., 1975). Для фибробластов 3Т3 показана четкая корреляция потребления сахара и пролиферации.

Rubin и сотрудники более детально исследовали потребление глюкозы в связи с клеточным циклом с использованием эмбриональных куриных фибробластов. Они показали, что стимуляция клеточного роста сывороткой, повышение pH или трансформация RSV приводят вначале к повышенной продукции лактата с последующим (через несколько часов) началом синтеза ДНК (Fodge, Rubin, 1973). Также стимулируются потребление глюкозы и фосфорилирование (Rubin, 1971), но эти факторы, по-видимому, не ограничивают интенсивность гликолиза, поскольку продукция лактата повышена даже в отсутствие экзогенной глюкозы (Fodge, Rubin, 1975). Угнетение гликолиза 2-дезоксиглюкозой, NaF или йодоацетатом предупреждает повышение интенсивности синтеза белков и ДНК (Rubin, 1971; Rubin, Fodge, 1974). Эти наблюдения полностью соответствуют наблюдениям Temin (1971). Из описанных выше исследований становится ясно, что для перехода клеток из вегетативного в пролиферативное состояние необходимы гликолиз сам по себе или продукция какого-то интермедиата гликолиза.

11.6.3. Внутриклеточное pH и гликолиз

Влияние повышения pH на стимуляцию роста и гликолиз, описанные выше (Fodge, Rubin, 1973), вполне закономерны. Как изложено в предыдущих разделах, существуют определенные значения внутри- и внеклеточного pH, оптимальные для роста клеток. Влияние pH окружающей среды на интенсивность гликолиза в клетках опухолей было впервые показано Warburg (Warburg et al., 1924). Результаты более поздних исследований, проведенных Fodge и Rubin (1973) в фибробластах и Minakami и сотрудниками (1975) в эритроцитах, показали, что интенсивность гликолиза повышается с повышением значения экстраклеточного pH с 7,0 до 8,0 и что опухолевые или трансформированные клетки менее чувствительны к изменениям pH, чем нормальные. Эти наблюдения интересны в свете того факта, что pH_i клеток асцитного рака Эрлиха менее чувствительно к изменениям pH_e, чем в нормальных клетках. Последующие исследования внутриклеточного pH и его связи с гликолизом дали неожиданные результаты (рис. 4).

Первое сообщение было получено от группы Minakami, показавшей, что хорошо известное влияние осмотических изменений на гликолиз эритроцитов опосредуется только изменениями внутриклеточного pH (Tomoda et al., 1977). Качественно сходные результаты получила группа Shulman, которая одновременно определяла внутриклеточное pH и интенсивность гликолиза E. coli с использованием ЯМР — ^{31}P (Ugurbil et al., 1978, 1979). Более недавние результаты, полученные группой Racker, показали зависимость внутриклеточного pH от гликолиза в клетках асцитного рака Эрлиха подобно тому, как это наблюдалось в отмеченных выше системах (Belt et al., 1979). Эти результаты неожиданны, так как клетки асцитного рака Эрлиха

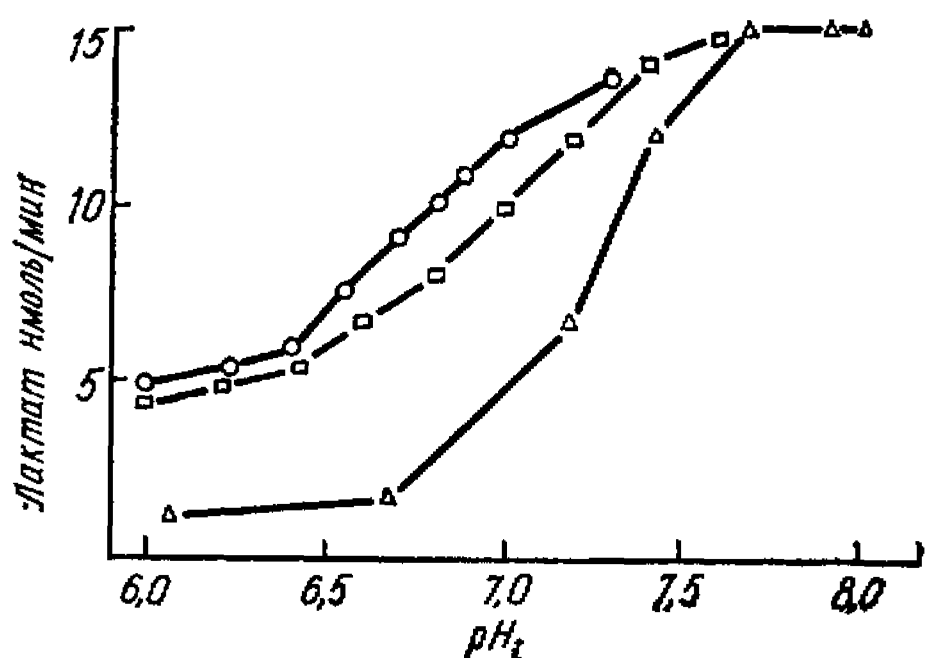


Рис. 4. Интенсивность гликолиза как функция внутриклеточного pH в трех системах: (□) — клетки асцитного рака Эрлиха, внутриклеточное pH варьировалось путем титрования внеклеточного pH и определялось с помощью реакции флюоресценции с 6-карбоксифлюоресцеином, накопление молочной кислоты определялось внутриклеточно и пересчитывалось на 0,5 г белка (Belt et al., 1979); (○) — E. coli, внутриклеточное pH определялось по методу с использованием ЯМР, а накопление лактата в среде определялось одновременно при анаэробных условиях. Собраны данные шести опытов при различных внешних условиях и температуре 20 °С, а продукция лактата рассчитана на один образец, примерно на 0,5—1,0 г белка (Ugurbil et al., 1978, 1979); (△) — эритроциты человека, внутриклеточное pH варьировалось путем титрования внеклеточного pH в присутствии или в отсутствие гиперосмотических концентраций сахарозы, при любом условии данные оказались сходными, поэтому суммированы здесь, продукция лактата пересчитана на 1 г гемоглобина, а pH_i определялось с использованием ДМО (Minakami et al., 1975; Tomoda et al., 1977).

известны как один из наиболее классических видов опухолевых клеток в том отношении, что в них отмечается высокая интенсивность аэробного гликолиза (Aisenberg, 1961). Racker (1972), постулируя, что туморогенез развивается в результате «повторяющихся изменений внутриклеточного pH», предсказал, что гликолиз в асцитных клетках имеет нормальную зависимость от pH_i.

11.6.4. Внутриклеточное pH и контроль гликолиза

Описанные выше исследования показали, что pH может влиять на интенсивность гликолиза в клетках опухолей in situ. Непосредственная точка приложения действия pH еще не установлена. Многие исследователи полагают, что pH-зависимость обусловлена ферментом фосфофруктокиназой (ФФК) (Wenner, 1975; Racker, 1972; 1976; Fodge, Rubin, 1973; Tomoda et al., 1977). Эта гипотеза подкрепляется анализом интермедиатов гликолиза при различных условиях роста. Кроме того, это подкрепляется наблюдениями, что изоферменты ФФК обычно ограничивают интенсивность гликолиза in vitro, и их профили оптимума pH обычно идентичны общему профилю pH для гликолиза (Atzpodien, Bode, 1970; Ramaiah, 1974; Banuelos et al., 1977; Meldolesi, Lacetti, 1979). К этому следует добавить предположение, что в клетках сердечной мышцы млекопитающих pH-зависимым фактором, ограничивающим интенсивность гликолиза, является фермент глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (ГЗФДГ) (Rovetto et al., 1975). По всей вероятности, гликолиз контролируется более чем одним фактором, выбор которого зависит от системы и условий. Активность ГЗФДГ и ФФК существенно зависит от pH, что может опосредоваться через специфический аллостерический эффект.

Одно из наиболее значительных новых наблюдений в области энзимной регуляции — взаимодействие многих гликолитических ферментов со специфическими рецепторами плазматической мембраны. Steck и сотрудники установили, что в эритроцитах СЗФДГ (Kant, Steck, 1973; Yu, Steck, 1975) и альдолаза (Strapazon, Steck, 1976, 1977) специфически связываются с интегрированными мембранными белками. Связывание — прочное, обратимое и существенно зависит от pH в рамках его физиологического диапазона. Подобные результаты получены при использовании

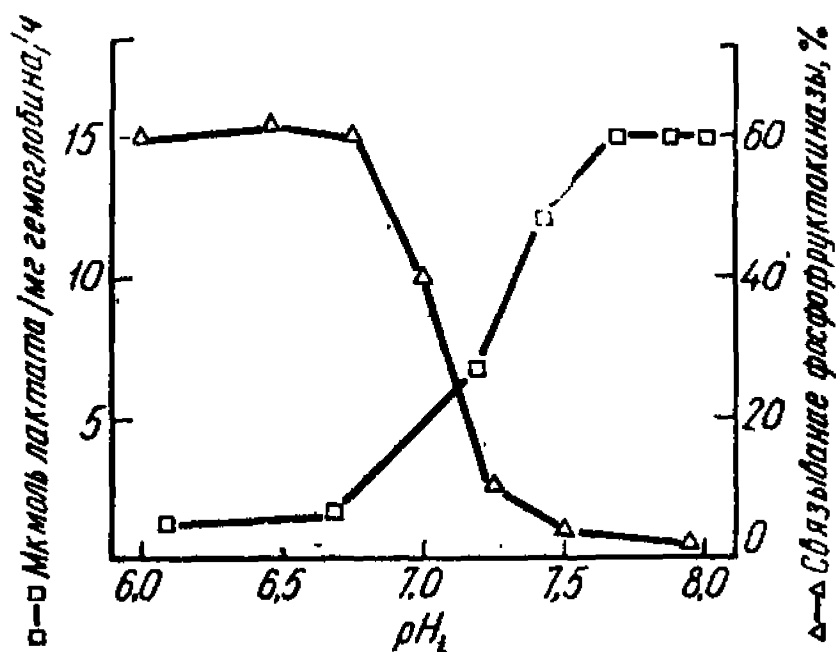


Рис. 5. Интенсивность гликолиза и связывание фосфофруктокиназы с мембранами эритроцитов как функция pH: (□) — продукция лактата в эритроцитах человека как функция внутриклеточного pH, условия идентичны условиям, описанным для эритроцитов на рис. 4; (△) — связывание ФФК с гемолизированными эритроцитами как функция pH in vitro (из Higashi et al., 1979).

фосфоглицераткиназы эритроцитов (De, Kitly, 1977) и ФФК (Karadsheh, Uyeda, 1977; Higashi et al., 1979). Этот феномен был также описан в других системах, таких, как ферменты цикла Кребса в мозге крыс (Waksman et al., 1977) и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа яиц морских ежей (Aune, Epel, 1978). Для иллюстрации pH-зависимости связывания и активности ферментов на рис. 5 показаны профили pH для фосфофруктокиназы эритроцитов. Видно, что при pH 6,75 фермент полностью связан и неактивен, а при pH 7,5 — растворим и активен. По крайней мере, в эритроцитах влияние pH на активность ФФК и гликолиз, по-видимому, опосредуется через модификацию связанного с мембраной аллостерического эффектора. Существование этого феномена в других системах и его взаимосвязь с физиологическими условиями in vivo остаются важными вопросами.

11.7. АКТИВАЦИЯ ЯИЦ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

Известно, что в некоторых системах изменения внутриклеточного pH могут повышать интенсивность гликолиза, что необходимо для перехода клеток из вегетативного в пролиферативное состояние. Неясно, однако, достаточно ли изменение внутриклеточного pH само по себе для стимуляции роста. Внеклеточное ощелачивание может индуцировать пролиферацию покоящихся фибробластов (Rubin, 1971; Ceccarini, Eagle, 1971; Fodge, Rubin, 1973; Eagle, 1974). Как описано в предыдущих разделах, в щелочной среде клетки утрачивают способность регулировать их внутриклеточное pH. Таким образом, возможно, что влияние ощелачивания окружающей среды на индукцию пролиферации опосредовано через pH_i. В работах данные эффекты хорошо описаны, однако исследователи не проводили измерения внутриклеточного pH. В настоящее время единственной системой, где показана роль внутриклеточного pH в стимуляции клеточного роста, является активация яиц морских ежей.

11.7.1. Последовательность активации

У морских ежей акт оплодотворения инициирует хорошо описанную серию процессов, обозначаемых как «последовательность активации», основным содержанием которой является метаболическая дерепрессия и начало роста в ранее покоящихся яйцах. Одним из самых ранних процессов последовательности является временная деполяризация плазматической мембраны (Hiramoto, 1959; Steinhardt et al., 1971; Jaffee, 1976), за которой через 1—2 мин следует выделение Ca^{2+} из внутреннего источника (Mazia, 1937; Nakamura, Yasumasu, 1974; Azarnia, Chambers, 1976), вызывая временное повышение содержания внутриклеточного свободного Ca^{2+} (Steinhardt et al., 1977). Почти одновременно с выделением Ca^{2+} повышается внутриклеточное pH с 6,7 до 7,3 (Johnson et al., 1976; Lopo, Vacquier, 1977; Shen, Steinhardt, 1978). Через некоторое время после повышения pH и содержания Ca^{2+} повышается продукция лактата (Yasumasu et al., 1973; Asami et al., 1975; Yanagisawa, 1975),

полимеризуется кортикальный актин (Begg, Rebhun, 1979), повышается проводимость K^+ (Steinhardt, Mazia, 1973) с последующим началом синтеза белков (Hultin, 1952; Epel, 1967; Hille, Albers, 1979) и затем синтезом ДНК (Mazia, Ruby, 1974; Vacquier, Brandriff, 1975). Фактически активация яиц морского ежа аналогична процессу трансформации, поскольку пролиферация покоящихся клеток активируется добавлением стимулов извне (Epel, 1977, 1978). В пределах данного вида последовательность активации во временно́м плане стабильна и представляет собой идеальную модельную систему изучения регуляции активации обмена и клеточной пролиферации.

11.7.2. Внутриклеточное pH и активация

Ранние процессы транспорта ионов в последовательности активации были хорошо изучены с помощью большого количества методов, в результате чего был сделан вывод, что изменения внутриклеточного pH сами по себе достаточны для стимуляции метаболизма и инициации роста. Было четко показано, что ранняя деполяризация, известная как потенциал активации, не играет роли в активации метаболизма. Искусственная деполяризация путем изменения электрического напряжения (Jaffee, 1976) или добавления KCl (Steinhardt, Mazia, 1973) не вызывает активации метаболизма. Предупреждение потенциала активации путем изменения электрического напряжения также не влияет на последующую активацию в результате оплодотворения.

Влияние повышенного содержания Ca^{2+} и внутриклеточного pH на активацию исследовалось с помощью партеногенов — веществ, искусственно активирующих яйца (Harvey, 1956). Мощным партеногеном является A23187 — ионофор Ca^{2+}, действующий путем индукции повышения как содержания Ca^{2+}, так и значений pH (Steinhardt, Epel, 1974; Chambers et al., 1974). Пока что не найден метод обработки, который позволил бы разделить процессы выделения Ca^{2+} из внутреннего источника и физиологического повышения внутриклеточного pH (Gillies, Deamer, 1981). Однако ион аммония партеногенетически активирует яйца путем искусственного повышения внутриклеточного pH (Winkler, Grainger, 1978; Shen Steinhardt, 1978). Обработка аммонием не влияет на внутренний источник Ca^{2+} (Zucker et al., 1978). Ясно, что основной результат действия аммония — искусственное повышение внутриклеточного pH, что само по себе достаточно для активации метаболизма в яйцах морских ежей (Epel, 1977; 1978).

11.7.3. Природа изменения pH

У морских ежей роль внутриклеточного pH в активации четко установлена. Неоплодотворенные яйца имеют внутреннее pH примерно 6,7, которое повышается до 7,3 через несколько минут после оплодотворения (Shen, Steinhardt, 1978; Johnson et al., 1976). Партеногенетическая активация аммиаком искусственно повышает вну-

Таблица 2. **Содержание кислото-лабильного CO_2 и Ca в экстрагированных и сожженных яйцах морского ежа Strongylocentrotus purpuratus** [1]

Условие	CO_2		Ca
	Экстрагированные этанолом яйца	Сожженные яйца	Сожженные яйца
Неоплодотворенные яйца	17,1±2,9	4,7±1,9	3,7±0,2
Оплодотворенные яйца	12,9±1,5	0,6±0,5	4,2±0,3
Различие	4,2	4,1	—0,5
p	<0,025	<0,005	НЗ

[1] Лишенные слизистой оболочки оплодотворенные и неоплодотворенные яйца S. purpuratus дегидрировались трехкратной обработкой 100 %-ным эталоном. Эталоновые экстракты тестировали прямо или сжигали при 450 °C в течение 8 ч. Кислото-лабильный CO_2 определялся манометрически путем уравновешивания порошка в манометрическом баллоне и измерения объема газа, выделяемого после добавления 1 мл 0,1 N HCl Ca^{2+} определяли в сгоревших образцах с помощью атомной абсорбционной спектроскопии. Все концентрации выражены количеством вещества (мкмоль), приходящегося на единицу объема (мл) экстрагированных яиц, и являются средним от шести различных измерений. Значения *p* определены по таблице Стьюдента как различие значений, полученных для оплодотворенных и неоплодотворенных яиц. НЗ — незначительные различия.

триклеточное pH, обходя предшествующие процессы в последовательности активации (Winkler, Graigner, 1978). Активация аммонием приводит к синтезу белка и ДНК, конденсации хромосом и в некоторых условиях — к делению клетки. Эти процессы прямо или косвенно индуцированы изменениями внутриклеточного pH.

В яйцах, активированных оплодотворением, повышение внутриклеточного pH сочетается с понижением pH окружающей морской воды (Runnström, 1933). Aketa (1957) предположил, что эта так называемая кислота оплодотворения представляет собой лактат. В другой работе этого не удалось установить (Rothschild, 1958), в результате чего было высказано предположение, что «кислотой оплодотворения» являются неорганический фосфат (Aketa, 1963) или простые изменения поверхностного заряда яиц (Mehl, Swann, 1961). Наиболее свежее сообщение предполагает, что такая кислота представляет собой протоны на основании наблюдения за стохиометрическим обменом протонных эквивалентов Na^+, проходящим через плазматическую мембрану, и эффекта предупреждения выделения кислоты амилоридом (Johnson et al., 1976). Недавно мы наблюдали, что при оплодотворении из яиц выделяется большое количество CO_2 (Gillies, Deamer, 1981). В целом на 1 мл объема яиц выделяется примерно 4 мкмоль CO_2, что в полной мере объясняет подкисление окружающей среды. CO_2 не является продуктом декарбоксилирования, но в неоплодотворенных яйцах содержится в виде неорганического комплекса. Это доказано тем, что определено различие содержания ислото-лабильного CO_2 в экстрактах оплодотворенных и неоплодотворенных яиц (в 4 мкмоль) при сжигании яиц при 450 °C в течение 8 ч (табл. 2). Как установлено с помощью рентгеновской дифрактометрии золы, сжигание полностью окисляет органические компоненты. Изучение ощелачивания внутриклеточного pH в результате

выделения неорганического карбоната является интересным направлением и должно быть как можно более полно исследовано в яйцах морских ежей и других системах.

11.7.4. Внутриклеточное pH и Ca^{2+} во время последовательности активации

В последовательности активации внутриклеточный Ca^{2+} выделяется из неизвестного источника примерно в то же самое время, что и неорганический карбонат. Как упоминалось выше, по-видимому, процессы выделения Ca^{2+} и карбоната интимно связаны, поскольку пока что не существует методики, способной разделить эти процессы. Косвенные данные указывают на то, что кальций и карбонат хранятся в клетке и выделяются вместе в виде $CaCO_3$. Появление внутриклеточного $CaCO_3$ было обнаружено в других системах (Pautard, 1970), его наблюдали в неоплодотворенных яйцах морских ежей с помощью рентгеновской диффракционной и плоскополяризационной световой микроскопии. Результатом солюбилизации $CaCO_3$ является, по-видимому, резкое повышение внутриклеточного pH и Ca^{2+}.

Резкое повышение значений внутриклеточного pH и Ca^{2+} также наблюдали во время клеточного цикла у Tetrahymena. Значения варьировали в зависимости от митотического индекса в культуре. Сейчас проводится работа по установлению и определению содержания неорганического карбоната во время активации яиц морских ежей и клеточного цикла Tetrahymena.

11.7.5. Внутриклеточное pH и метаболизм в яйцах морских ежей

Аммиак активирует неоплодотворенные яйца морских ежей путем искусственного повышения внутриклеточного pH. Как установлено ранее, повышение pH_i может быть ответственно за повышение интенсивности гликолиза после оплодотворения, хотя прямой взаимосвязи пока еще не было обнаружено. Интересно, что угнетение гликолиза йодацетамидом в яйцах морских ежей, так же как и в фибробластах и лимфоцитах, предупреждает их активацию (Aketa, 1957). Однако добавление аммиака стимулирует не только гликолиз, но и многие другие метаболические процессы в яйцах морских ежей. Анализ процессов, интенсивность которых повышается под влиянием аммиака, показывает, какие из них, по крайней мере, частично контролируются pH_i (Epel, 1978). Этот подход впервые использовали Steinhardt и Mazia (1973), наблюдавшие, что активация аммиаком приводит к повышению проводимости K^+ и синтезу ДНК. Такая активация не вызывает резкого повышения потребления кислорода, наблюдаемого после оплодотворения, но повышает уровень синтеза белка (Epel et al., 1974), конденсации хромосом (Mazia, 1974; Mazia, Ruby, 1974) и полиаденилирования иРНК (Wilt, Mazia, 1974). Эффект аммиака зависит от его концентрации: для повышения синтеза белка достаточно небольшое количество аммиа-

ка, для конденсации хромосом необходима высокая его концентрация (Epel et al., 1974).

Указанные изменения обмена в результате активации аммиаком происходят независимо. Повышение проводимости K^+ не связано с синтезом белков или ДНК (Epel et al., 1974), а синтез белков не является необходимым для начала синтеза ДНК (Black et al., 1967). Недавно было установлено, что повышение проводимости K^+ уникально чувствительно к изменениям внутриклеточного pH. Кроме того, in vitro был обнаружен четкий профиль оптимального pH для синтеза белков (Grainger et al., 1979). Характер этих данных предполагает присутствие интермедиата. Brandis и Raff (1979) недавно установили, что активация аммиаком повышает интенсивность тотального белкового синтеза, но не снижает рибосомального транзитного времени, как это наблюдается при оплодотворении. Изменение pH демаскирует ранее не транскрибированную иРНК, возможно, путем полиаденилирования.

11.8. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО pH С ДРУГИМИ ПЛЕЙОТРОПНЫМИ ФАКТОРАМИ

Недавно появились сведения о том, что пролиферацию покоящихся клеток индуцируют многие вещества: факторы роста, антигены, митогены, гормоны и протеазы (Clarkson, Baserga, 1974; Sato, Ross, 1979; LoBue, Portmesil, 1975). Эти факторы обычно взаимодействуют с рецепторами на клеточной поверхности, иногда стимулируют синтез специфических белков, но почти постоянно индуцируют пролиферацию рецепторных клеток. В скоординированном ответе на действие этих эффекторов участвует любое количество внутриклеточных «вторичных» посредников (Sutherland et al., 1968), которые влияют на многие стороны физиологии клетки и трансформируют ее в пролиферативное состояние. Большинство хорошо изученных вторичных посредников являются щелочными катионами Na^+ и K^+ (Kaplan, 1978), дивалентными катионами Ca^{2+} и Mg^{2+} (Rasmassen, Goodman, 1977; Pastan, Johnson, 1976) и циклическими нуклеотидами (Pastan et al., 1975; Pastan, Johnson, 1974). Известно, что мишенью действия Ca^{2+} и циклических нуклеотидов является система протеинкиназ, фосфорилирующих специфические белки (Krebs, Beavo, 1979). Здесь невозможно дать исчерпывающий обзор эффектов и взаимодействий указанных внутриклеточных интермедиатов. Мы отсылаем читателя к другим главам данной монографии, в которых речь идет о циклических нуклеотидах (гл. 7) и катионах (гл. 5 и 12). В последующих разделах мы будем рассматривать возможную роль внутриклеточного pH в модуляции эффектов и реакций вторичных посредников.

11.8.1. Внутриклеточное pH и щелочные катионы

При обсуждении роли Na^+ и K^+ в контроле роста вырисовываются три различных феномена, которые могут играть роль в этих процессах. Во-первых, ионы сами по себе могут быть важны для

осуществления некоторых реакций в клетке. Во-вторых, Na^+ и K^+ являются основными детерминантами потенциала плазматической мембраны (E_m). Наконец, распределение ионов и E_m интимно связано с Na^+, K^+-АТФазой, которая может потреблять бо́льшую часть клеточной энергии. Угнетение АТФазы сердечными гликозидами, такими, как оубаин, вызывает перераспределение ионов, рассеивание мембранного потенциала и нарушение равновесия пула аденилатфосфата. Эти взаимоотношения трудно разрешить эмпирически. В этом разделе мы дадим обзор взаимосвязи щелочных катионов и E_m, с одной стороны, а также pH_i и стимуляции роста — с другой, не касаясь пока дискуссии о фосфатном пуле.

11.8.1.1. Калий

Повышенное поглощение K^+ — один из наиболее ранних процессов, возникающих после стимуляции лимфоцитов ФГА (Quastel, Kaplan, 1970; Kay, 1972). Известно, что такое поглощение частично опосредуется повышенной активностью АТФазы (Averdunk, Lauf, 1975). Подобные явления наблюдаются при вирусной трансформации фибробластов (Karasov, Friedman, 1974; Kimelberg, Manev, 1974) и стимуляции гепатоцитов инсулином (Blatt et al., 1972). Ингибитор АТФазы — оубаин — предупреждает стимулирующий эффект ФГА на лимфоциты, хотя это угнетение обратимо при добавлении в среду избытка K^+ (Quastel, Kaplan, 1968). Процессы синтеза белков требуют K^+, и при концентрации внутриклеточного K^+ менее 80 % нормальной, синтез белков будет полностью угнетен (Ledbetter, Lubin, 1977). На транспорт K^+ влияет концентрация внутриклеточного Ca^{2+} как по оубаин-чувствительным (Schwartz, 1976), так и по оубаин-нечувствительным (Lew, Ferreira, 1971; Gilbert, 1971; Wenner, Hackney, 1976) механизмам. Также известно, что поступление K^+ и E_m варьируют в течение клеточного цикла (Jung, Rothstein, 1977; Sachs et al., 1974; Stambrook et al., 1974).

11.8.1.2. Натрий

Na^+ также участвует в контроле роста. Хорошо известно, что транспорт Na^+ имеет большое значение для транспорта сахаров и аминокислот (Schultz, Curran, 1970). Повышенная Na^+-проницаемость ассоциирована с развитием карциномы грудной железы (Shen et al., 1978). Кроме того, установлено, что в трансформированных эпителиальных клетках и гепатоцитах содержатся в 2 и 4 раза бо́льшие количества Na^+, чем в их нормальных аналогах (Smith et al., 1978; Sparks, Cameron, 1979; Cameron et al., 1979).

11.8.1.3. Мембранный потенциал

Принимая во внимание роль Na^+ и K^+, не удивительно, что E_m также ассоциируется с контролем роста клеток. Как уже отмечалось, в некоторых системах E_m изменяется в течение клеточного

цикла. Нормальные и неопластические фибробласты 3Т3 имеют низкое E_m при пролиферации и гиперполяризуются при слиянии (Cone, Tongier, 1973). Деполяризация стационарных клеток стимулирует их деление (Orr et al., 1972; McDonald et al., 1972). Синтез ДНК начинается даже в терминально дифференцированных нейронах при их деполяризации (Cone, Cone, 1976). Эти феномены включены в «унифицирующую теорию онкогенеза», выдвинутую Cone (1971). Роль Na^+, K^+ и E_m в контроле клеточного роста и неоплазии более подробно рассмотрена в гл. 12 Pool и соавт.

11.8.1.4. Внутриклеточное pH

Наиболее прямая взаимосвязь, установленная между внутриклеточным pH и моновалентными катионами,— антитранспортная. Как уже отмечалось (см. гл. 11.2), в некоторых системах внутриклеточное pH регулируется частично обменом Na^+/H^+ (Thomas, 1977; Aiken, Thomas, 1977). При имеющемся антипорте Na^+/H^+ повышение внутриклеточного содержания Na^+ в опухолевых клетках сопряжено с более щелочным внутриклеточным pH, которое, как было показано в предыдущих разделах, стимулирует гликолиз и рост.

Недавно Ohki и сотрудники (1978) исследовали механизм действия локальных анестетиков на наркотизацию аксона омара. Они наблюдали, что аминоанестетики третьего порядка уменьшают амплитуду потенциалов действия в зависимости от их концентрации и pH. Они также заметили, что первичный эффект лекарственных веществ — повышение внутриклеточного pH, которое ответственно за наркотизацию. Ощелачивание внутриклеточной среды третичными аминоанестетиками наблюдалось также в других системах (Lopo, Vacquier, 1977; Steinhardt et al., 1977; Lacko et al., 1978) и, по-видимому, соответствует модели распределения аминов, впервые предложенной Jacobs (1922). Возможно, что эффект щелочного внутриклеточного pH на амплитуду потенциала действия опосредуется либо через повышение концентрации Na^+ (см. выше), либо через понижение содержания Ca^{2+} (см. ниже).

Другой эффект внутриклеточного pH на реакции моновалентных катионов заключается в титровании мест связывания. Это явление наблюдалось в мембранах (Sanui, 1970; Sanui, Pace, 1962) и молекулах ферментов. Alvarado и Mahmood (1979) показали in vitro pH-зависимость активирования щелочных катионов инвертазы (КФ 3.2.1.48). Они обнаружили, что при pH ниже 7,0 ионы Li^+, K^+ или Na^+ снижают K_M фермента к субстрату аллостерически. При pH выше 7,0 щелочные катионы проявляют свое ингибирующее действие путем понижения V_{max}. Авторы делают вывод, что аллостерические сайты поддаются титрованию, полностью депротонированы и недейственны при значениях pH выше нейтральных. Хотя в этой системе имеется в виду внеклеточное pH, она дает возможность предположить, что титрование активных или аллостерических сайтов имеет также место на внутриклеточных ферментах в ответ на изменения внутриклеточного pH и взаимодействует со связыванием катионов щелочи.

11.8.2. Внутриклеточное рН и дивалентные катионы

В последние годы стало ясно, что внутри- и внеклеточное содержание Ca^{2+} и Mg^{2+} играет основную роль в контроле клеточного роста. Однако не ясно, воздействует ли на клетки прямое взаимодействие этих катионов с акцепторами или же их эффекты опосредуются через взаимодействие с другими плейотропными факторами. Ca^{2+} и Mg^{2+} конкурируют между собой за места связывания на мембранах (Sanui, 1970) и АТФ (Villar-Palasi, Wei, 1970). Ионы Ca^{2+} могут влиять на транспорт Na^{+} и K^{+} (Judah, Ahmed, 1963; Moscatelli et al., 1979; Romero, Whittham, 1971), также хорошо известно, что они взаимодействуют с циклическими нуклеотидами (Rasmussen, Goodman, 1977).

11.8.2.1. Магний

Ионы Mg^{2+}, вероятно, играют наиболее важную роль, поскольку они специфически связываются с белками и АТФ. Mg^{2+} наиболее часто служит кофактором ферментов (Wyatt, 1964) и сильно влияет на активность фосфорилирующих систем (Blair, 1968; Kuo et al., 1971; Takai et al., 1976; Bittar, Sharp, 1979; Cockcroft, Gomperts, 1979). В эритроцитах человека содержание тотального внутриклеточного Mg^{2+} оценивается 1,6 мМ, а свободная концентрация 95 мкМ — в активно гликолизирующих клетках и 247 мкМ — при угнетенном гликолизе (Rose, 1968). Rubin (1975) установил, что понижение концентрации наружного Mg^{2+} значительно угнетает рост куриных эмбриональных фибробластов и фибробластов 3Т3, а если концентрация Mg^{2+} поддерживается на уровне свыше 0,24 мМ, клеточный рост нечувствителен к изменениям концентрации Ca^{2+} (Rubin, Koide, 1976). Однако при пониженной концентрации наружного Mg^{2+} чувствительность к Ca^{2+} восстанавливается. Ионы Mg^{2+}, несомненно, важны для контроля клеточного роста, а места приложения его действия определяются способностью образовывать хелаты с АТФ и выступать в роли ферментного кофактора.

11.8.2.2. Кальций

Ионы Ca^{2+} также вовлечены в контроль клеточного роста. Во многих системах наблюдается повышение содержания Ca^{2+} в клетке после обработки веществами, стимулирующими рост (Rasmussen, Goodman, 1977). Пути влияния Ca^{2+} на рост клеток многочисленны. Ca^{2+} влияет на текучесть клеточной мембраны (Jacobson, Papahadjapoulos, 1975), ионный транспорт (Romero, Whittham, 1971), транспорт глюкозы (Clausen et al., 1975; Shudt et al., 1976), деполимеризацию микротрубочек (Marcum, Borisy, 1978) и конденсацию хроматина (Leake et al., 1972; Jacobs et al., 1976). Само по себе добавление Ca^{2+} в некоторых условиях может индуцировать клеточный рост (Rasmussen et al., 1972; Whitfield et al., 1973). Тотальное внутриклеточное содержание Ca^{2+} в клетках млекопитающих составляет при-

мерно 5 мМ, а свободного цитоплазматического Ca^{2+} — примерно 100 нМ (Rasmussen, Goodman, 1977). Остаток внутриклеточного Ca^{2+} связан в таких органеллах, как митохондрии и эндоплазматический ретикулум (Moore et al., 1975). Многие из плейотропных эффектов Ca^{2+} опосредуются через его взаимодействие с белками специфического Са-зависимого регулятора (КЗР) (Cohen et al., 1978). Здесь нет возможности описывать многочисленные системы, на которые влияют белки КЗР, тем более что недавно был опубликован обзор (Cheung, 1980), посвященный этим белкам. Во многих случаях белки КЗР регулируют активность протеинкиназы (Bittar, Sharp, 1979; LePeuch et al., 1979). Недавно было обнаружено высокое количество растворимого цАМФ-фосфодиэстеразо-специфического белка КЗР (кальмодулина) в вирустрансформированных и быстро размножающихся куриных эмбриональных фибробластах и низкое количество — в стационарных клетках (Watterson et al., 1976; van Eldik, Watterson, 1979). В заключение можно сказать, что ионы Ca^{2+} влияют на клеточный рост и метаболизм в результате конкуренции с ионами Mg^{2+} или же путем индукции специфических процессов, опосредованных белками КЗР.

11.8.2.3. Внутриклеточное pH

Большая часть данных указывает на то, что протоны эффективно конкурируют с дивалентными катионами за места связывания, и наоборот. Только в некоторых системах было обнаружено, что на связывание Mg^{2+} влияет pH. Хорошо известно, что аффинность АТФ к магнию понижается в кислом диапазоне pH (Rosing, Slater, 1972; Rubin, 1975). Константа диссоциации Арсеназо III для Mg^{2+} также повышается при кислом pH (Russel, Martonosi, 1978; Ogan, Simons, 1978). Подобно этому связывание Ca^{2+} с тропонином С мышцы кролика (белок КЗР) определяется изменениями pH в физиологическом диапазоне (Robertson et al., 1978). Дивалентные катионы также оказывают влияние на pH-зависимые процессы, такие, как сборка субъединиц глютаматдегидрогеназы (LeJohn et al., 1969).

Prusch, Hannafin (1979) обнаружили, что понижение внутриклеточного pH в Amoeba proteus повышает количество Ca^{2+}, обмениваемого в пределах клетки. Подобный феномен наблюдался также в мышце усоногого рака после инъекции экворина (Ashley, Lea, 1978) и мышце лягушки (Shlevin, 1979). Противоположное исследование было проведено Meech, Thomas (1977) с использованием нейронов улитки. Они обнаружили, что инъекция небольшого количества $CaCl_2$ в клетки немедленно повышает E_m на 10—20 мВ, снижает внутриклеточное pH на 0,04—0,15 единицы и не влияет на внутриклеточную концентрацию ионов Na^+. Как E_m, так и pH_i восстанавливаются экспоненциально, но с различными временными константами. Медленное инъецирование CaCl снижает внутриклеточное pH и не влияет на E_m. Кроме того, присутствие HCO_3^- в омывающем растворе уменьшает влияние Ca^{2+} на внутриклеточное pH, по-видимому, путем повышения внутриклеточной буферной способности. Инъекция

$MgCl_2$ не влияет ни на E_m, ни на внутриклеточное pH. Описанные исследования предполагают, что ионы Ca^{2+} и H^+ конкурируют за места связывания в клетке или же они принимают участие в обмене H^+/Ca^{2+} через митохондриальную мембрану (Reynafarje, Lehninger, 1974).

Протоны также способны конкурировать с Ca^{2+} и Mg^{2+} за связывающие места на клеточной поверхности, как показано в результате применения промывочных методик Sanui (Sanui, 1970; Sanui, Pace, 1972; Sanui, Rubin, 1979). Этот автор обнаружил, что катионы, связанные с мембраной, могут быть селективно отмыты от клеток, причем эффективность методики зависит от pH промывающего раствора. При использовании более кислых сред катионы отмываются быстро и полностью, в то время как нейтральные растворы совсем не эффективны. Влияние pH на связывание катионов с мембраной и текучесть мембраны, однако, изучено недостаточно. Единственный фосфолипид, титрующийся в физиологическом диапазоне значений pH,— фосфатидная кислота (van Dijk et al., 1978). Однако физиологическое pH может быть не связано с pK фосфолипидов in situ, поскольку pH возле заряженных поверхностей значительно отличается от pH в среде. Эффект pH на мембраны, не зависящий от дивалентных катионов, наблюдался в мионевральном соединении лягушки (Landay, Nachsen, 1975). Уменьшение pH от 7,4 до 6,0 повышает частоту минимального пластиночного потенциала при факторе 2,5, и этот эффект не зависит от присутствия Ca^{2+} или Mg^{2+}. При низком pH также снижается количество квантов, выделяющихся на потенциал действия, однако этот эффект обратим при добавлении избытка Mg^{2+}. Возможным объяснением этих наблюдений является то, что протоны титруют мембранные сайты и влияют на способность нейронов реагировать на спонтанные или индуцированные стимулы. При низком pH также повышается связывающая способность саркоплазматического ретикулума для Ca^{2+} (Nakamaru, Schwartz, 1970), которая, по-видимому, включает как ферментный (секвестрация), так и связанный с проницаемостью мембран (выделение) pH-зависимые компоненты (Dunnett, Nayler, 1978).

11.8.3. Внутриклеточное pH и циклические нуклеотиды

Несомненно участие цАМФ и цГМФ как вторичных посредников в координированной реакции в ответ на стимуляцию клеточного роста. Вследствие большого числа данных и сложности этой проблемы мы не будем пытаться сделать обзор сведений об участии циклических нуклеотидов в контроле роста клеток. Вместо этого мы отошлем читателя к другим, более исчерпывающим обзорам о роли циклических нуклеотидов в контроле клеточного роста (Pastan et al., 1975), корреляции цАМФ и трансформации фибробластов (Pastan, Johnson, 1974), гипотезе «Yin-Yang» — координированное действие цАМФ и цГМФ в регуляции клеточного роста (Goldberg et al., 1974) и о взаимоотношении ионов Ca^{2+} и циклических нуклеотидов в контроле роста (Rasmussen, Goodman, 1977). Современные взгляды

на роль циклических нуклеотидов в трансформации представлены в гл. 7.

В недавно проведенных опытах Bittar и Sharp обнаружили, что высокие концентрации цГМФ стимулировали поступление Na^+ в мышечные клетки усоногих раков, и на эту реакцию влияли изменения внутриклеточного pH. При микроинъекции цАМФ наблюдается идентичный эффект (Bittar et al., 1976), в связи с чем была предложена гипотеза о влиянии цГМФ на поступление Na^+ посредством его взаимодействия с цАМФ-зависимой протеинкиназой (Kuo et al., 1971). Тем не менее инъекция любого нуклеотида в волокна немедленно стимулирует поступление Na^+, не чувствительное к оубаину (Bittar et al., 1974). На интенсивность ответа не влияют изменения наружной концентрации Na^+, K^+ или Mg^{2+}, однако она изменяется в зависимости от наружной концентрации Ca^{2+} и внутри- и внеклеточного pH. При изменении концентрации наружного Ca^{2+} от 0 до 15 мМ поступление Na^+ изменяется линейно от 30 до 200 % и совершенно не зависит от изменений внутриклеточного содержания ионов Ca^{2+}. Если наружное pH, поддерживаемое буфером HEPES, понижать с 7,2 до 5,8, наблюдается 10-кратное увеличение поступления Na^+, при изменениях же pH в щелочном диапазоне — свыше 7,0 — такого эффекта не наблюдается. Использование бикарбонатного буфера, напротив, делает поступление Na^+ чувствительным к изменению pH в диапазоне свыше 7,0, стимулирует его в 3 раза при понижении внеклеточного pH с 7,8 до 7,0. Бикарбонат слегка подкисляет внутриклеточную среду и делает внутриклеточное pH более зависимым от внеклеточного pH. Добавление активатора цГМФ-зависимой протеинкиназы (Kuo et al., 1976) не влияет на поступление ионов Na^+. Ингибитор цАМФ-зависимой протеинкиназы полностью подавляет ответ. На основании этих данных был сделан вывод, что стимуляция циклическими нуклеотидами поступления Na^+ опосредуется цАМФ-зависимой протеинкиназой. Активность этого фермента в большой степени зависит от изменений pH в физиологическом диапазоне (Kuo, Greengard, 1970), что может объяснять описанные выше результаты. Однако эти данные можно также объяснить тем, что поступление ионов Na^+ происходит путем обмена Na^+/H^+, осуществляемого через электрохимический градиент H^+. Весьма интересно предположение о том, что на обмен Na^+/H^+ влияет циклическая нуклеотид-зависимая протеинкиназа, такая возможность нуждается в дальнейшем исследовании.

Кроме того, что pH_i модулирует ответ клетки на действие циклических нуклеотидов, было обнаружено, что цАМФ, в свою очередь, изменяет внутриклеточное pH. В слизистом грибе Dictyostelium discoideum наномолярное количество цАМФ индуцирует двухкомпонентное (быстрое и медленное) повышение внутриклеточного pH (Malchow et al., 1978). цАМФ, цГМФ и аналог цАМФ — цАМФ-фосфоротиоат — индуцируют вначале быструю (10 с), затем переходящую в более медленную (6 мин) экструзию протоновых эквивалентов, происходящую по принципу «доза — эффект». Для индукции такого ответа требовалась концентрация цГМФ на несколько порядков

выше, чем физиологическая, что указывает на возможное его взаимодействие с цАМФ-зависимой протеинкиназой.

цАМФ также смягчает изменения pH_i в ответ на кислотную нагрузку в мышце сердца млекопитающих. Clancy и сотрудники обнаружили, что обработка норэпинэферином (НЭ) (Riegle, Clancy, 1975), глюкагоном или дибутирил-цАМФ (Fenton et al., 1978) уменьшает изменения pH_i в ответ на респираторный или метаболический ацидоз. Буферная сила среды в мышечных клетках сердца крыс, используемых в данной работе, повышалась в 3 раза в результате обработки НЭ и в 6 раз в присутствии глюкагона или дибутирил-цАМФ. Эффект гормонов на pH_i, по-видимому, опосредуется цАМФ. Последний может влиять на буферную способность через повышение эффективности угольной ангидразы (Thomas, 1976) или повышение активности кислото-экструзионных систем.

Boron и сотрудники (1978) исследовали описанный выше феномен в мышце усоногого рака. Как описывалось в разделе 2, ответ этой системы на кислотную нагрузку заключается в обмене внутриклеточного Cl^- на HCO_3^- среды. В присутствии 1—20 мкМ цАМФ внутриклеточное pH восстанавливается после кислотной нагрузки в 4 раза медленнее. Стимулирующий эффект цАМФ чувствителен к блокаторам анионных канальцев, что предполагает повышение активности эндогенной системы обмена Cl^-/HCO_3^-. цГМФ не влияет на регуляцию pH, изменяющегося в ответ на кислотные нагрузки. Если поддерживать наружное и внутриклеточное pH на значениях 7,3, цАМФ стимулирует как поступление, так и выход ионов Cl^-. Эти наблюдения могут быть важны при изучении опухолевых клеток, подверженных длительным кислотным нагрузкам в связи с высокой интенсивностью метаболизма (см. гл. 2). Как подчеркивалось в предыдущих параграфах, гормоны, повышающие уровни внутриклеточного цАМФ, могут влиять на внутриклеточное pH путем стимуляции обмена Cl^-/HCO_3^- или обмена Na^+/H^+.

Введение глюкагона в перфузируемую селезенку индуцирует глюконеогенез и вызывает гипергликемию. Первое звено в цепи процессов, ведущих к стимуляции глюконеогенеза,— повышение внутриклеточного цАМФ (Dambach, Friedman, 1974). Само по себе введение цАМФ индуцирует гипергликемию (Sengputa, Rous, 1978). Сразу же после введения глюкагона или цАМФ в перфузируемую селезенку ионы Ca^{2+} выходят из клетки, а ионы K^+ и Na^+ — поступают в клетку, и внутриклеточное pH повышается (Friedman, 1972). Это согласуется с действием цАМФ на внутриклеточное pH, описанным в предыдущих разделах. Вместе с тем в печени наблюдается двухфазный ответ: через несколько минут наблюдается обратный транспорт ионов, и внутриклеточное pH понижается. Было постулировано, что пониженное внутриклеточное pH участвует в регуляции глюконеогенеза вместе с ионами Ca^{2+} (Hastings, Longmore, 1965; Rasmussen et al., 1974). Низкое pH также сопоставимо с пониженной активностью фосфорилазы *a*, являющейся контролирующим звеном в гликогенолизе (Fischer et al., 1976). Тетракаин — аминоанестетик третьего

порядка — повышает pH_i и блокирует гипергликемическую реакцию на глюкагон (Friedman, 1972). Интересно отметить, что ацетазолимид — ингибитор угольной ангидразы — также индуцирует гипергликемию in vivo, и его эффект предупреждается при инъекции липосом, содержащих угольную ангидразу (Sengputa, Rous, 1978). Из описанных выше исследований становится очевидно, что гормоны, взаимодействуюшие с цАМФ, также влияют на внутриклеточное pH, а его изменения, в свою очередь, изменяют многие клеточные процессы и особенно метаболизм сахаров.

11.8.4. Внутриклеточное pH и фосфорилирование

Как ранее отмечалось, плейотропный эффект Ca^{2+} и циклических нуклеотидов на клеточный рост и метаболизм часто опосредуется специфическими протеинкиназами и фосфатазами. Важными аспектами физиологической регуляции являются процессы фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов и структурных белков. Здесь мы не будем пытаться описать многочисленные реакции, опосредуемые протеинкиназами, поскольку по этой теме имеется много доступных исчерпывающих обзоров (Krebs, 1972; Rubin, Rosen, 1975; Nimmo, Cohen, 1977; Krebs, Beavo, 1979). В этом разделе мы рассмотрим взаимодействие pH и регуляции ферментов через фосфорилирование и присутствие фосфата.

Неорганический фосфат с pK_a примерно 7,2 — единственный мажорный клеточный метаболит, имеющий значения pK в физиологическом диапазоне, при изменении pH от 7,0 до 7,6. Это наблюдение важно с точки зрения наличия субстрата, а также свободной энергии.

При pH 7,0 примерно 30 % неорганического фосфата (P_i) присутствует в виде HPO_4^{2-} и 70 % — в виде $H_2PO_4^-$. При pH 7,4 наблюдается почти обратная картина. Изменение pH в физиологическом диапазоне (см. раздел 4) может во многом изменить эффективный внутриклеточный пул P_i. Поскольку активные и аллостерические сайты энзимов обычно ионоспецифичны, предполагается, что в реакциях, включающих P_i, предпочтительным субстратом или эффектом является моновалентный или дивалентный фосфат (Shoun et al., 1979). Наличие P_i может быть фактором, регулирующим интенсивность биосинтеза АТФ (Robinson, Flaschner, 1979), и было постулировано, что конкуренция между гликолизом и дыханием за P_i лежит в основе пастеровского эффекта (Aisenberg, 1961; Wenner, 1975; Ramaiah, 1974 Racker, 1976). Неорганический фосфат также стимулирует активность дрожжевой фосфофруктокиназы в зависимости от pH (Banuelo et al., 1977). Средней точкой для стимуляции фосфатом фосфофруктокиназы in vitro является pH примерно 7,2, стимуляторный эффект повышается при кислом pH. Эти результаты предполагают, что предпочтительным эффектором в этой системе является $H_2PO_4^-$. Отсюда логично постулировать, что изменения внутриклеточного pH влияют на системы фосфорилирования путем прямого взаимодействия с пулом неорганического фосфата.

Свободная энергия гидролиза АТФ также чувствительна к изменениям pH (Rosing, Slater, 1972). Другими словами, количество свободной энергии, выделяющейся при расщеплении АТФ на АДФ и P_i, увеличивается с повышением pH. Увеличение количества свободной энергии является результатом повышенной энтропии для реакций при более высоких значениях pH в связи с выделением протона из продукта P_i. Свободная энергия гликолиза также зависит от концентрации Mg^{2+}, но тем не менее повышается сверх 0,5 ккал/моль АТФ при изменении значения pH от 7,0 до 7,5 при температуре 37 °С. Если АТФ используется в киназной реакции, изменение свободной энергии в реакции определяется p*K* фосфатного продукта.

С точки зрения термодинамики все реакции, включающие фосфат, чувствительны к изменениям pH. Это не означает, что фосфатазные и киназные реакции прямо зависят от pH, однако вместе с тем в некоторых случаях pH может играть важную роль. До сих пор еще не получено достаточного числа данных для подтверждения гипотезы, заключающейся в том, что pH влияет на обмен через его взаимодействия с фосфатными реакциями (Gerson, 1978). Насколько нам известно, влияние pH на присутствие субстратного фосфата и свободную энергию гидролиза АТФ является практически неизученным вопросом, хотя это может частично объяснить профиль pH, оптимального для образования АТФ (Shamoo, Brodsky, 1972; Brodsky, Shamoo, 1973).

11.9. ВЫВОДЫ

В свете данных, представленных в этой главе, можно сделать некоторые общие заключения о внутриклеточном pH и его роли в регуляции пролиферации клеток эукариотов.

1. Известно, что при физиологических условиях энергизации и низких концентрациях метаболических кислот в наружной среде клетки эукариотов поддерживают свое внутреннее pH в строго определенных границах. Гомеостатическая регуляция внутриклеточного pH осуществляется путем продукции метаболических кислот и диффузии протона вниз по его электрохимическому градиенту в комбинации с регулируемой, опосредованной носителями, экструзией протоновых эквивалентов. Было постулировано, что резкие изменения внутриклеточного pH возникают в результате солюбилизации внутриклеточных запасов $CaCO_3$. На поддержание постоянного pH_i неблагоприятно влияют повышенные концентрации в среде метаболических кислот, таких, как молочная кислота и CO_2. Однако присутствие некоторого количества HCO_3 в среде необходимо, так как оно повышает внутриклеточную буферную способность, опосредованную взаимодействием с системой обмена Cl^-/HCO_3^- и угольной ангидразой. Обнаружено, что внутриклеточную буферную способность повышает также цАМФ через взаимодействие с системой CO_2/HCO_3^-.

2. Установлено, что в ходе клеточных циклов Physarum и Tetrahymena, а также во время последовательности активации яиц морских ежей происходит повторяющийся сдвиг внутриклеточного pH.

Кроме того, также сообщалось об изменениях pH в ответ на гормональную стимуляцию гепатоцитов и обработку клеток асцитного рака Эрлиха глюкозой. pH изменялось примерно на 0,4 единицы как в щелочном (клеточный цикл, активация, гормоны), так и в кислом (гормоны, глюкоза) направлении. Физиологический диапазон внутриклеточного pH — 7,2 ± 0,4. В яйцах морских ежей было отчетливо видно, что сдвиг pH в щелочную сторону ответствен за метаболическую активацию.

3. Обнаружено, что гликолиз зависит от изменений внутриклеточного pH in situ. Постулировано, что pH-чувствительным звеном в гликолизе является фосфофруктокиназа, что подтверждается многими наблюдениями, сделанными in vitro. Эти наблюдения важны в связи с тем, что повышенная интенсивность гликолиза является необходимой ступенью в стимуляции пролиферации клеток. Также установлено, что изменения внутриклеточного pH влияют на синтез белков и реакцию клеток на плейотропные вторичные посредники, такие, как катионы щелочи, дивалентные катионы и циклические нуклеотиды. Кроме того, постулировано, что к изменениям pH чувствительны реакции фосфорилирования, хотя это нуждается в эмпирическом подтверждении in situ.

4. В случае гликолиза активность фосфофруктокиназы, вероятно, зависит от обратимого связывания энзима со специфическими сайтами на внутренней поверхности плазматической мембраны. В гемолизированных эритроцитах это взаимодействие сильно зависит от pH. Этот феномен также наблюдается с другими ферментами метаболизма, хотя эффект охарактеризован хуже. Большинство специфических аллостерических эффектов pH и его связь с ситуацией in situ нуждаются в дальнейшем изучении.

Наблюдения, представленные в данной главе, поднимают серьезные методологические и феноменологические вопросы. Внутриклеточное pH представляет собой высококонтролируемый, хотя и изменяющийся параметр клеточной физиологии. В некоторых системах показано, что внутриклеточное pH является важным фактором, участвующим в контроле обмена и роста. Поэтому исследователи должны осознавать, что на pH_i может влиять большое количество экспериментальных условий, таких, как присутствие или отсутствие HCO_3^- в буферных растворах, повышенные концентрации кислот или аминов, а также концентрация катионов вне клеток.

При анализе факторов, вносящих вклад в трансформированное состояние, становится ясно, что любой механизм должен на каком-то этапе включать компонент плейотропной или повсеместной природы. Протоны — повсеместны и, как установлено, влияют на многие параметры, связанные с контролем клеточного роста. В настоящее время нельзя ясно проследить роль pH_i в регуляции клеточного роста. Это связано скорее с недостаточностью, чем с разноречивостью имеющихся данных. Есть надежда, что в ближайшем будущем основные закономерности, касающиеся роли pH_i в контроле роста, будут более понятны.

11.10. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Ahmed S. A., Baron D. N. (1971). Intracellular pH measured in isolated normal human leukocytes, by using DMO under conditions of varying extracellular pCO_2 and bicarbonate. Clin. Sci. 40, 487—495.

Aickin C. C., Thomas R. C. (1975). Microelectrode measurement of the internal pH of crab muscle fibres. J. Physiol. (London) 252, 803—815.

Aickin C. C., Thomas R. C. (1977a). Microelectrode measurement of the intracellular pH and buffering power of mouse soleus muscle fibres. J. Physiol. (London) 267, 791—810.

Aickin C. C., Thomas R. C. (1977b). An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. J. Physiol. (London) 273, 295—316.

Aisenberg A. C. (1961). «The Glycolysis and Respiration of Tumors.» Academic Press, New York.

Aketa K. (1957). Quantitative analyses of lactic acid and related compounds in sea urchin eggs at the time of fertilization. Embryologia 3, 267—278.

Aketa K. (1963). Studies on the acid production at fertilization of sea urchin eggs. Exp. Cell. Res. 30, 93—97.

Alvarado F. Mahmood A. (1979). pH dependent effects of the alkali metal ions on intestinal brush-border sucrase. J. Biol. Chem. 254, 9534—9541.

Asami K., Fujiwara A., Shoger R. L., Yasumasu I. (1975). Reversal of ATP inhibition of phosphofructokinase by nucleotides and phosphate as a possible regulatory mechanism of sea urchin egg glycolysis. Cell Struct. Funct. 1, 43—50.

Ashley C. C., Lea T. J. (1978). Intracellular free Ca^{++} increased by lowering intracellular pH. J. Physiol. (London) 282, 21P.

Atzpodien W., Bode H. (1970). Purification and regulatory properties of ATP-sensitive PFK from yeast. Eur. J. Biochem. 12, 126—132.

Aune T. M., Epel D. (1978). Increased intracellular pH shifts subcellular localization of G6PDH. J. Cell. Biol. 79, 164a.

Averdunk R., Lauf P. K. (1975). Effects of mitogens on sodium-potassium transport, ^{3}H-ouabain binding, and ATPase activity in lymphocytes. Exp. Cell Res. 93, 331—342.

Azarnia R., Chambers E. L. (1976). The role of divalent cations in activation of the sea urchin egg. J. Exp. Zool. 198, 65—78.

Banuelos M., Gancedo C., Gancedo M. (1977). Activation by phosphate of yeast phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 252, 6394—6398.

Battaglia F., Behrman R., Hellegers A. Battaglia J. (1965). Intracellular hydrogen ion concentration changes during acute respiratory acidosis and alkalosis. J. Pediatr. 66, 737—742.

Becker B. F., Duhm J. (1978). Evidence for anionic cation transport of lithium, sodium and potassium across the human erythrocyte membrane induced by divalent anions. J. Physiol. (London) 282, 149—168.

Begg D. A., Rebhun L. I. (1979). pH regulates the polymerization of actin in the sea urchin egg cortex. J. Cell Biol. 83, 241—248.

Belt J. A., Thomas J. A., Buchsbaum R. N., Racker E. (1979). Inhibition of lactate transport and glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells by bioflavinoids. Biochemistry 18, 3506—3511.

Bittar E.E., Sharp D. M. (1979). Stimulation by CGMP of sodium efflux in barnacle muscle fibers. J. Physiol. (London) 293, 135—151.

Bittar E. E., Chambers G., Schultz R. (1974). On the mode of action of cyclic nucleotides on Na^+ efflux in single barnacle muscle fibers. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 33, 1359—1366.

Bittar E. E., Chambers G., Schultz R. (1976). Mode of stimulation by cAMP of the Na^+ efflux in barnacle muscle. J. Physiol. (London) 257, 561—579.

Bittar E. E., Danielson B. G., Lin W., Richardo J. (1977). An investigation of the effects of external acidification on Na^+ transport, pH and membrane potential in barnacle muscle. J. Membr. Biol. 34, 223—230.

Black R., Baptist E., Piland J. (1967). Puromycin and cyclohexamide inhibition of thymidine incorporation into DNA of cleaving sea urchin eggs. Exp. Cell. Res. 48, 431—439.

Blair J. (1968). Metal ions and enzyme equilibria: A mathematical treatment. FEBS Lett. **1**, 100—103.
Blatt L. M., McVerry P. H., Kim K.-H. (1972). Regulation of hepatic glycogen synthetase of Rana catesbeiana. Inhibition of the action of insulin by ouabain. J. Biol. Chem. **247**, 6551—6554.
Bolton T., Vaughan-Jones R. (1977). Continuous direct measurement of intracellular chloride and pH in frog skeletal muscle. J. Physiol. (London) **270**, 801—823.
Boron W. F. (1977). Intracellular pH transients in giant barnacle muscle fibers. Am. J. Physiol. **233**, C61—C73.
Boron W. F., DeWeer P. (1976a). Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO_2, NH_3 and metabolic inhibitors. J. Gen. Physiol. **67**, 91—112.
Boron W. F., DeWeer P. (1976b). Active proton transport stimulated by CO_2/HCO_3^-, blocked by cyanide. Nature (London) **259**, 240—241.
Boron W. F., Russell J. M., Brodwick M. S., Keifer D. W., Roos A. (1978). Influence of cAMP on intracellular pH regulation and chloride fluxes in barnacle muscle fibers. Nature (London) **276**, 511—513.
Brandis J., Raff R. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilization. Nature (London) **278**, 467—469.
Brodsky W. A., Shamoo A. E. (1973). Binding of ATP to and release from microsomal ($Na^+ + K^+$) — ATPase. Biochim. Biophys. Acta **291**, 208—228.
Burger M. M. (1973). Surface changes in transformed cells detected by lectins. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **32**, 91—98.
Burk D., Behrens O., Suguira K. (1941). Metabolism of butter yellow rat liver cancers. Cancer Res. **1**, 733—740.
Burk D., Woods M., Hunter J. (1967). On the significance of glycolysis for cancer growth with special reference to Morris rat hepatomas. J. Natl. Cancer Inst. **38**, 839—846.
Calothy C., Croce C. M., Defendi V., Koprowski H., Eagle H. (1973). Effect of environmental pH on rescue of simian virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 366—368.
Cameron I. L., Jeter J. R. (1970). Synchronization of the cell cycle of Tetrahymena by starvation and refeeding. J. Protozool. **17**, 429—431.
Cameron I. L., Smith N. K. R., Pool T. B., Sparks R. L. (1979). Intracellular sodium concentration as related to mitogenesis and to oncogenesis. J. Cell. Biol. **83**, 7a. (Abstr.)
Carter R., Nijhout M. (1977). Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. Science **195**, 407—409.
Ceccarini C., Eagle H. (1971a). Induction and reversal of contact inhibition of growth by pH modification. Nature (London) New Biol. **233**, 271—273.
Ceccarini C., Eagle H. (1971b). pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **68**, 229—233.
Chambers E., Pressman B , Rose B. (1974). The activation of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X537A. Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 126—132.
Cheung W. Y. (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science **207**, 19—27.
Clarkson B., Baserga R., eds. (1974). «Control of Proliferation in Animal Cells.» Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Clausen T., Elbrink J., Dahl-Hansen A. B. (1975). The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues IX. The role of cellular calcium in the activation of the glucose transport system in rat soleus muscle. Biochem. Biophys. Acta **375**, 292—308.
Cockcroft S., Gomperts B. D. (1979). Activation and inhibition of calcium-dependent histamine secretion by ATP ions applied to rat mast cells. J. Physiol. (London) **296**, 229—243.
Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. (1978). Identification of the Ca^{++}-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. FEBS Lett. **92**, 287—293.
Colby C., Romano A. H. (1975). Phosphorylation but not transport of sugars is enhanced in virus transformed mouse 3T3 cells. J. Cell. Physiol. **85**, 15—21.

Cone C. D., Jr. (1971). Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. J. Theor. Biol. **30**, 151—181.
Cone C. D., Jr., Cone C. M. (1976). Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. Science **192**, 155—158.
Cone C. D., Jr., Tongier M., Jr. (1973). Contact inhibition of division: Involvement of the electrical transmembrane potential. J. Cell. Physiol. **82**, 373—386.
Crabtree H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. Biochem. J. **23**, 536—545.
Dambach G., Friedman N. (1974). The effects of varying ionic composition of the perfusate on liver membrane potential, gluconeogenesis and cAMP responses. Biochim. Biophys. Acta **332**, 374—386.
De B. K., Kirtly M. E. (1977). Interaction of phosphoglyceratekinase with human erythrocyte membranes. J. Biol. Chem. **252**, 6715—6720.
Demetradopoulos G. E., Linn B., Amos H. (1978). Rapid loss of ATP by tumor cells deprived of glucose: Contrast to normal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **82**, 787—794.
Den Hollander J., Ugurbil K., Brown T., Lee T., Shulman R. (1981). ^{31}P NMR studies of anerobic and aerobic glycolysis in S. cerevisiae. Biochemistry (in press).
DeWeer P. (1978). Intracellular pH transients induced by CO_2 or NH_3. Respir. Physiol. **33**, 41—50.
DeWit J. L., Schafasma T. J. (1978). A^{13} C and ^{1}H NMR study on rod-like polymerization of tobacco mosaic virus protein. FEBS Lett. **92**, 273—277.
Dickins F. (1936). The metabolism of normal and tumour tissue. Biochem. J. 30, 1233—1241.
Dubinsky W., Racker E. (1978). The mechanism of lactate transport in human erythrocytes. J. Membr. Biol. **44**, 25—36.
Dunnett J., Nayler W. G. (1978). Effect of pH on the uptake and efflux of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. J. Physiol. (London) **281**, 16P.
Eagle H. (1971). Buffer combinations for mammalian cell culture. Science **174**, 500—503.
Eagle H. (1973). The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. J. Cell. Physiol. **82**, 1—8.
Eagle H. (1974a). Some metabolic effects of environmental pH on normal and cancer cells. Miami Winter Symp. 8, 161—172.
Eagle H. (1974b). Some effects of environmental pH on cellular metabolism and function. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 1—11. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Eden M., Haines B., Kahler H. (1955). The pH of rat tumors measured in vivo. J. Natl. Cancer Inst. **16**, 541—556.
Elliott A. M. (1973). «The Biology of Tetrahymena». Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania.
Ellis D., Thomas R. C. (1976a). Microelectrode measurement of the intracellular pH of mammalian heart cells. Nature (London) **262**, 224—225.
Ellis D., Thomas R. C. (1976b). Direct measurement of the intracellular pH of mammalian cardiac muscle, J. Physiol. (London) **262**, 755—771.
Epcl D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: A «late» response to fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **57**, 889—906.
Epel D. (1977). Regulation of cell activity at fertilization by intracellular Ca^{++} and intracellular pH. In «The Molecular Basis of Cell-Cell Interactions» (R. A. Lerner and D. Bergsma, eds.), pp. 377—388. Alan R. Liss, New York.
Epel D. (1978). Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Curr. Top. Dev. Biol. **12**, 186—246.
Epel D., Steinhardt R., Humphreys T., Mazia D. (1974). An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia: The existance of independent pathroays. Dev. Biol. **40**, 245—255.
Epstein L., Stohlman F. (1964). RNA synthesis in cultures of normal human peripheral blood. Blood **24**, 69—75.
Fenton R. A., Gonzales N. C., Clancy R. L. (1978). The effect of dibutyryl cAMP and glucagon on the myocardial cell pH. Respir. Physiol. **32**, 213—223.

Fields B. N., Eagle H. (1973). The pH-dependence of reovirus synthesis. Virology 52, 581—583.
Fischer A. (1925). «Tissue Culture. Studies in Experimental Morphology and General Physiology of Tissue Cells in Vitro.» Levin & Munksgaard, Copenhagen.
Fischer E. H., Becker J., Blum H. E., Byes B., Heizmann C., Kerrick G., Lehky P., Malencik D. A., Pocinwong S. (1976). Concerted regulation of glycogen metabolism and muscle contraction. In «Molecular Basis of Motility» (L. M. G. Heilmeyer, J. C. Reugg and T. Wieland, eds.), pp. 137—158. Springer-Verlag. Berlin and New York.
Fitzgerald P. (1964). The immunological role of long life span of small lymphocytes. J. Theor. Biol. 6, 13—15.
Fodge D. W., Rubin H. (1973). Activation of phosphofructokinase by stimulants of cell multiplication. Nature (London), New Biol. **246**, 181—183.
Fodge D. W., Rubin H. (1975). Stimulation of lactic acid production in chick embryo fibroblasts by serum and high pH in the absence of external glucose. J. Cell. Physiol. 86, 453—458.
Folbergrova J., MacMillan V., Siesjo B. K. (1972a). The effect of moderate and marked hypercapnia upon the energy state and upon the cytoplasmic NADH/ NAD^+ ratio of the rat brain. J. Neurochem. **19**, 2497—2505.
Folbergrova J., MacMillan V., Siesjo B. K. (1972b). The effect of hypercapnic acidosis upon some glycolytic and Krebs cycle-associated intermediates in the rat brain. J. Neurochem. 19, 2507—2517.
Folkman J. (1974). Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. 9, 331—358.
Friedman N. (1972). Effects of glucagon and cAMP on ion fluxes in the perfused liver. Biochim. Biophys. Acta **274**, 214—225.
Frydenberg O., Zeuthen E. (1960). Oxygen uptake and carbon dioxide output related to the mitotic rhythm in the cleaving eggs of Dendraster excentricus and Urichis caupo. C. R. Trav. Lab. Carlsberg **31**, 423—455.
Fujita A. (1928). Uber den Stoffwechsel der Korperzellen. Biochem. Z. **197**, 175—188.
Garcia-Sancho J., Sanchez A. (1979). Use of salicylic acid to measure the apparent intracellular pH in the Ehrlich ascites cell and E. coli. Biochim. Biophys. Acta **509**, 148—158.
Gerson D. F. (1978). Intracellular pH and the mitotic cycle in Physarum and mammalian cells. In «Cell Cycle Regulation» (J. Jeter, I. Cameron, G. Padilla and A. Zimmerman, eds.), pp. 105—129. Academic Press. New York.
Cerson D. F., Burton A. C. (1976). The relation of cycling of intracellular pH to mitosis in the acellular slime mould Physarum polycephalum. J. Cell. Physiol. 91, 297—304.
Gilbert I. G. F. (1971). The effects of divalent cations on the ionic permeability of cell membranes in normal and tumor tissues. Eur. J. Cancer 8, 99—109.
Gillies R. J., Deamer D. W. (1979a). Intracellular pH changes during the cell cycle in Tetrahymena. J. Cell. Physiol. **100**, 23—32.
Gillies R. J., Demaer D. W. (1979b). Intracellular pH: Methods and applications. Curr. Top. Bioenerg. 9, 63—89.
Gillies R. J., Deamer D. W. (1981). CO_2 flux alters intracellular pH after fertilization in sea urchins. J. Cell Physiol. (in press).
Gillies R. J., Deamer D. W. (1980). Endogenously produced CO_2 leads to growth arrest in Tetrahymena. J. Cell. Physiol. 105, 221—226.
Goldberg N. D., Haddox M. D., Dunham E., Lopez C., Hadden J. W. (1974). The Yin Yang hypothesis of biological control; Opposing influences of cGMP and cAMP in the regulation of cell proliferation and other biological processes. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 609—625. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Grainger J. L., Winkler M. M., Shen S. S., Steinhardt R. A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early amryo. Dev. Biol. 68, 396—406.
Hartwell L. H. (1971). Genetic control of cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. J. Mol. Biol. 59, 183—194.
Hartwell L. H., Culotti J., Reid B. (1970). Genetic control of the cell division cycle in yeast. I. Detection of mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 66, 352—359.

Marcum J., Bortsy G. (1978). Characterization of microtubule protein oligomers by analytical centrifugation. J. Biol. Chem. 253, 2825—2833.
Mazia D. (1937). The release of calcium in Arbacia eggs following fertilization. J. Cell. Comp. Physiol. 10, 291—304.
Mazia D. (1974). Chromosome cycles turned on in unfertilized sea urchin eggs exposed to NH_4OH. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 690—693.
Mazia D., Ruby A. (1974). DNA synthesis turned on in unfertilized sea urchin eggs by treatment with NH_4OH. Exp. Cell. Res. 85, 167—172.
Meech R.W., Thomas R. C. (1977). The effect of calcium injection on the intracellular sodium and pH of snail neurones. J. Physiol. (London) 265, 867—879.
Mehl J. W., Swann M. M. (1961). Acid and base production at fertilization in the sea urchin. Exp. Cell. Res. 22, 233—245.
Meldolesi M. F., Lacetti P. (1979). Rat thyroid phosphofructokinase. Comparison of the regulatory and molecular properties with those of rat muscle enzyme. J. Biol. Chem. 254, 9200—9203.
Messeter K., Siejso B. K. (1971). The intracellular pH in the brain in acute and sustained hypercampnia. Acta Physiol. Scand. 83, 210—219.
Meyer K. A., Kammerling E. M., Amtman L., Koller M., Hoffman S. (1948). pH studies of malignant tissues in human beings. Cancer Res. 8, 513—523.
Minakami S., Tomoda A., Tsuda S. (1975). Effect of intracellular pH change on red cell glycolysis. In «Erythrocyte Structure and Function,» pp. 149—162. Alan R. Liss, New York.
Moore L., Chen T., Knapp H. R., Landon E. J. (1975). Energy-dependent calcium sequestration activity in rat liver microsomes. J. Biol. Chem. 250, 4562—4568.
Morris H. (1965). Studies on the development, biochemistry and biology of experimental hepatomas. Adv. Cancer Res. 9, 228—302.
Moscatelli E., Sanui H., Rubin H. (1979). Effects of depletion of K^+, Na^+ or Ca^{++} on DNA synthesis and cell cation content in chick embryo fibroblasts. J. Cell. Physiol. 101, 117—128.
Mueller G. (1971). Biochemical perspectives of the G_1 and S intervals in the replication cycle of animal cells: A study in the control of cell growth. In «The Cell Cycle and Cancer» (R. Baserga, ed.), pp. 269—308. Dekker, New York.
Naesland J. (1955). Further attempts at direct chemical attack upon malignant tumors, based on the change of the pH after injection of glucose and malonate. Acta Soc. Med. Ups. 60, 150—160.
Nakamaru Y., Schwartz A. (1970). Possible control of intracellular calcium metabolism by H^+: Sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 830—836.
Nakamura M., Yasumasu I. (1974). Mechanism for increase in intracellular concentration of free calcium in fertilized sea urchin egg. A method for estimating intracellular concentration of free calcium. J. Gen. Physiol. 63, 374—388.
Navon G., Ogawa S., Shulman R. G., Yamane T. (1977a). ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of Ehrlich ascites tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 87—91.
Navon G., Ogawa S., Shulman R. G., Yamane T. (1977b). High resolution ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of metabolism in aerobic E. coli sells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A. 74, 888—891.
Navon G., Shulman R. G., Yamane T., Eccleshall R. T., Lam K.-B., Baranofsky J. J., Marmur J. (1979). ^{31}P NMR studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of S. cerevisiae. Biochemistry, 18, 4487—4499.
Neely J. R., Whitmer J. T., Rovetto M. J. (1975). Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. Circ. Res. 37, 733—741.
Nigra T. P., Martin G. R., Eagle H. (1973). The effect of environmental pH on collagen synthesis by cultured cells Biochem. Biophys. Res Commun. 53, 272—281.
Nimmo H G., Cohen P. (1977). Hormonal control of protein phosphorylation. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8, 146—266.
Ogan K., Simons E. R. (1978). Response of Arsenazo III to pH changes. Biophys. J. 21, 46a.

Ohki S., Shinagawa Y., Cravis C. (1978). Mode of action of tertiary amine local anaesthetics on axon membrane exictability. Biochem. Biophys. Acta **507**, 395—407.
Oppenheim J. J. (1978). Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity in guinea pigs and man. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **27**, 21—28.
Orr C. W., Yoshikawa-Fukada M., Ebert J. D. (1972). Potassium: Effect on DNA synthesis and multiplication of baby hamster kidney cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 243—247.
Pachman L. (1967). The carbohydrate metabolism and respiration of isolated small lymphocytes. Blood 30, 691—706.
Pardee A. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **71**, 286—290.
Pastan I., Johnson G. S. (1974). Cyclic AMP and the transformation of fibroblasts. Adv. Cancer Res. **19**, 303—329.
Pastan I., Johnson G. S., Anderson W. B. (1975). Role of cyclic nucleotides in frowth control. Annu. Rev. Biochem. **44**, 491—524.
Pasteur L. (1876). «Etudes sur la biere,» Gauthier-Villars, Paris.
Pautard F. G. E. (1970). Calicification in unicellular organisms. In «Biological Calcification» (H. Schraer, ed.), pp. 105—201. Appleton, New York.
Pfeiffer S. E., Eagle H. (1976). Effect of ethansesulfonic acid buffers and pH on the accumulation of a nervous system-specific protein (S—100) and a glial-enriched enzyme in a clonal line of rat astrocytes (C_6). J. Biol. Chem. **251**, 5112—5114.
Polgar P. R., Foster J. M., Cooperband S. R. (1968). Glycolysis as an energy source for stimulation of lymphocytes by phytohemagglutanin. Exp. Cell Res. 49, 231—237.
Poole D. (1967). Intracellular pH of the Ehrlich ascites tumor as it is affected by sugars and sugar derivatives. J. Biol. Chem. **242**, 3731—3736.
Poole D., Butler T. C., Williams M. E. (1971). Effects of valinomycin, ouabain and potassium on glycolysis and intracellular pH of Ehrlich ascites tumor cells. J. Membr. Biol. 5, 261—276.
Poole D., Butler T. C., Williams M. E. (1972). The effects of nigericin, valinomycin and 2,4-dinitrophenol on intracellular pH, glycolysis and K^+ concentration of Ehrlich ascites tumor cells. Biochim. Biophys. Acta **266**, 463—470.
Prescott D. M. (1976). The cell cycle and the control of cellular reproduction. Adv. Gent. **18**, 100—177.
Prusch R. D., Hannafin J. (1979). Calcium distribution in Amoeba proteus. J. Gen. Physiol. **74**, 511—521.
Quastel M. R., Kaplan J. G. (1968). Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by PHA in vitro. Nature (London) 219, 198—200.
Quastel M. R., Kaplan J. G. (1970a). Lymphocyte stimulation: The effect of ouabain on nucleic acid and protein synthesis. Exp. Cell Res. **62**, 407—420.
Quastel M. R., Kaplan J. G. (1970b). Early stimulation of potassium uptake in lymphocytes treated with PHA. Exp. Cell Res. **63**, 230—233.
Racker E. (1972). Bioenergetics and the problem of tumor growth. Am. Sci. 60, 56.
Racker E. (1976). Why do tumor cells have a high aerobic glycolysis? J. Cell. Physiol. 89, 697—700.
Ramaiah A. (1974). Pasteur effect and phosphofructokinase. Curr. Top. Cell. Regul. **12**, 298—345.
Rasmussen H., Goodman D. B. P. (1977). Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. Physiol. Rev. **57**, 422—509.
Rasmussen H., Goodman D. B. P., Tenenhouse A. (1972). The role of cAMP and calcium in cell activation. CRC Crit. Rev. Biochem. **1**, 95—122.
Rasmussen H., Bordier P., Kurokawa K., Nagata N., Ogata E. (1974). Hormonal control of skeletal and mineral homeostasis. Am. J. Med. 56, 751—763.
Rasmussen H., Goodman D. B. P., Friedman N., Allen J. E., Kurokawa K (1976). Ionic control of metabolism. In «Handbook of Physiology: Endocrinology» (R. O. Greep and E. B. Astwood, eds.). Vol. **7**, pp. 225—264. Am. Physiol. Soc. Washington, D. C.

Riegle K. M., Clancy R. L. (1975). Effect of norepinepherine on myocardial intracellular pH. Am. J. Physiol. 229, 344—349.
Reynafarje B., Lehninger A. L. (1974). The cause of superstochiometric Ca^{++} uptake and H^+ ejection in L1210 mouse ascites tumor mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 286—293.
Robbins J., Nicholson G. (1975). Surfaces of normal and transformed cells. In «Cancer: A Comprehensive Treatise» (F. F. Becker, ed.), Vol. 4, pp. 3—54. Plenum, New York.
Robertson S. P., Johnson J. D., Potter J. D. (1978). The effects of pH on calcium binding to the Ca^{++} — Mg^{++} and the Ca^{++}-specific sites of rabbit skeletal TnC. Biophys. J. 21, 16a.
Robinson J. D., Flashner M. S. (1979). The (Na^+ + K^+) — activated ATPase. Enzymatic and transport properties. Biochim. Biophys. Acta 549, 145—176.
Romano A. H., Colby C. (1973). SV40 virus transformation of mouse 3T3 cell does not specifically enhance sugar transport. Science 179, 1240 —1242.
Romero B., Whittham C. (1971). The control by internal Ca^{++} of membrane permeability to Na^+ and K^+. J. Physiol. (London) 214, 481—501.
Roos A. (1975). Intracellular pH and distribution of weak acids acros cell membranes. J. Physiol. (London) 249, 1—25.
Roos A., Boron W. F. (1981). Intracellular pH. Physiol. Rev. (in press).
Rose I. (1968). The state of magnesium in cells as estimated from the adenylate kinase equilibrium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 61, 1079—1086.
Rosenfeld O., Lasnitzki A. (1928). Uber den Stoffwechsel stationarer und wachsender Gewebe. Biochem. Z. 196, 340—425.
Rosing J., Slater E. (1972). The value of G° for the hydrolysis of ATP. Biochim. Biophys. Acta 267, 275—290.
Rothschild Lord (1958). Acid production after fertilization of sea urchin eggs. J. Exp. Biol. 35, 843—849.
Rottenberg H. (1979). The measurement of membrane potential and pH gradient in cells, organelles and vesicles. In «Methods in Enzymology, Vol. 55: Biomembranes, Part F» (S. Fleischer and L. Packer, eds.), pp. 547—569. Academic Press, New York.
Rovetto M., Lamberton W., Neely J. (1975). Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. Circ. Res. 37, 742—751.
Rubin C. S., Rosen O. M. (1975). Protein phosphorylation. Annu. Rev. Biochem. 44, 831—887.
Rubin H. (1971). pH and population density in the regulation of animal cell multiplication. J. Cell Biol. 51, 686—702.
Rubin H. (1975). Central role for magnesium in coordinate control of metabolism in animal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3551—3555.
Rubin H., Fodge D. (1974). Interrelationships of glycolysis, sugar transport and the initiation of DNA synthesis in chick embryo cells. In «Control of Proliferation in Animal Cells» (B. Clarkson and R. Baserga, eds.), pp. 801—816. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Rubin H., Koide T. (1976). Mutual potentiation by magnesium and calcium of growth in animal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, 3551—3555.
Runnstrom J. (1933). Zur Kenntnis der Stoffwechselvorgange bei der Entwicklungserregung des Seeigeleies. Biochem. Z. 258, 257—279.
Russell J. M., Boron W. F. (1976). Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. Nature (London) 264, 73—74.
Russell J. T., Martonosi A. N. (1978). The influence of pH on the absorbtion spectrum of Arsenazo III. Biochim. Biophys. Acta 544, 418—429.
Sachs H. G., Stambrook P. J., Ebert J. D. (1974). Changes in membrane potential during the cell cycle. Exp. Cell Res. 83, 362—366.
Sanui H. (1970). pH dependence of the effect of ATP and EDTA on Na^+ and Mg^{++} binding by cellular membrane fragments. J. Cell. Physiol. 75, 361—368.
Sanui H., Pace N. (1972). Sodium and potassium binding by human erythrocyte ghosts. J. Cell Comp. Physiol. 59, 251—257.

Sanui H., Rubin H. (1979). Measurement of total, intracellular and surface bound cations in animal cells grown in tissue culture. J. Cell. Physiol. 100, 215—226.
Sato G. H., Ross R. (1979). «Hormones and Cell Culture», Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
Scarpa A., Cecchetto A., Azzone G. F. (1970). The mechanism of anion translocation and pH equilibration in erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 219, 179—188.
Schloerb P. R., Blackburn J. J., Grantham D. S., Mallard D. S., Cage G. K. (1965). Intracellular pH and buffering capacity of the Walker-256 carcinoma. Surgery 58, 5—11.
Schudt C., Gaertner U., Pette D. (1976). Insulin action on glucose transport and calcium fluxes in developing muscle cells in vitro. Eur. J. Biochem. 68, 103—111.
Schultz S. G., Curran P. F. (1970). Coupled transport of sodium and organic solutes. Physiol. Rev. 50, 637—710.
Schwartz A. (1976). Cell membrane Na^+, K^+-ATPase and sarcoplasmic reticulum: Possible regulators of intracellular ion activity. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 35, 1279—1282.
Seitz I. (1965). Biochemistry of normal and leukemic leukocytes, thrombocytes and bone marrow cells. Adv. Cancer Res. 9, 167—227.
Sengputa S., Rous S. (1978). Inhibition of the hyperglycemic effect of cAMP by intravenous injection to mice of carbonic anhydrase entrapped in liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 795—799.
Shamoo A. E., Brodsky W. A. (1972). Functions of the E-ATP and E-P complexes in the membrane ATPase reaction. Biochim. Biophys. Acta 255, 220—230.
Shen S., Steinhardt R. A. (1978). Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. Nature (London) 272, 253—254.
Shen S., Hamamoto S. T., Bern H. A., Steinhardt R. A. (1978). Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. Cancer Res. 38, 1356—1361.
Shlevin H. H. (1979). Effects of external calcium concentration and pH on charge movement in frog skeletal muscle. J. Physiol. (London) 288, 129—158.
Shoun H., Higashi N., Beppu T., Nakamura S., Hiromi K., Arima K. (1979). Studies on the interaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase with NADPH. Effects of pH and substrates on the enzyme-NADPH complex formation. J. Biol. Chem. 254, 10944—10951.
Sisken J., Morasca L., Kibby S. (1965). Effects of temperature on the kinetics o· the mitotic cycle of mammalian cells in culture. Exp. Cell Res. 39, 103—116.
Smith N. R., Sparks R. L., Pool T. B., Cameron I. L. (1978). Differences in the intracellular concentration of elements in normal and cancerous liver cells as determined by X-ray microanalysis. Cancer Res. 38, 1952—1959.
Sparks R. L., Cameron I. L. (1979). High intracellular levels of sodium as related to the transformation of mammary epithelium. J. Cell Biol. 83, 2a.
Spencer T. L., Lehninger A. L. (1976). L-Lactate transport in Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. J. 154, 405—414.
Stambrook P. J., Sachs H. G., Ebert J. D. (1974). The effect of potassium on the cell membrane potential and the passage of synchronized cells through the cell cycle. J. Cell. Physiol. 85, 283—292.
Steenbergen C., Deleeuw G., Rich T., Williamson J. R. (1977). Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. Circ. Res. 41, 849—858.
Stein R., Blum J. (1979). Quantiative analysis of intermediary metabolism in Tetrahymena. J. Biol. Chem., 254, 10385—10395.
Steinhardt R. A., Epel D. (1974). Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 1915—1919.
Steinhardt R. A., Mazia D. (1973). Development of K^+-conductance and membrane potentials in unfertilized sea urchin eggs after exposure to NH_4OH. Nature (London) 241, 400—401.
Steinhardt R. A., Lundin L., Mazia D. (1971). Bioelectric responses of the echinoderm egg to fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 68, 2426—2431.

Steinhardt R. A., Zucker R., Schatten G. (1977). Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol. 1, 185—196.
Strapazon E., Steck T. L. (1976). Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 15, 1421—1424.
Strapazon E., Steck T. L. (1977). Interaction of aldolase and the membrane of human erythrocytes. Biochemistry 16, 2966—2971.
Sutherland E., Robinson G., Butcher R. (1968). Some aspects of the role of adenosine 3' : 5'-monophosphate (cAMP). Circulation 37, 279—306.
Takai Y., Nakaya S., Inoue M., Kishimoto A., Nishiyama K., Yamamura H., Nishizura Y. (1976). Comparison of mode of activation of cGMP and cAMP dependent protein kinases from silkworm. J. Biol. Chem. 251, 1481—1487.
Temin H. M. (1971). Stimulation by serum of multiplication of stationary chick cells. J. Cell. Physiol. 78, 161—172.
Thomas J. A., Buchbaum R. N., Zimniak A., Racker E. (1979). Intracellular pH measurement in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. Biochemistry 18, 2210—2218.
Thomas R. C. (1974). Intracellular pH of snail neurones measured with a new pH-sensitive glass micro-electrode. J. Physiol. (London) 238, 159—180.
Thomas R. C. (1976a). Ionic mechanism of the H^+pump in a snail neurone. Nature (London) 262, 54—55.
Thomas R. C. (1976b). The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. J. Physiol. (London) 255, 715—735.
Thomas R. C. (1977). The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. J. Physiol. (London) 273, 317—338.
Tomoda A., Tsuda-Hirota S., Minakami S. (1977). Glycolysis of red cells suspended in solutions of impermeable solutes. J. Biochem. (Tokyo) 81, 697—701.
Ugurbil K., Rottenberg H., Glynn P., Shulman R. G. (1978). ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of bioenergetics and glycolysis in anaerobic E. coli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 2244—2248.
Ugurbil K., Shulman R. G., Brown T. R. (1979). High-resolution ^{31}P and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of Escherichia coli cells in vivo. In «Bibliogical Applications of Magnetic Resonance», pp. 537—589. Academic Press, New York.
Vacquier V. D., Brandriff B. (1975). DNA synthesis in unfertilized sea urchin eggs can be turned on and turned off by the addition and removal of procaine hydrochloride. Dev. Biol. 47, 12—31.
van Dijck P. W. M., de Kruiff B., Verkleij A. J., van Deenen L. L. M., de Gier J. (1978). Comparative studies on the effects of pH and Ca^{++} on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphotidylcholine. Biochim. Biophys. Acta 512, 84—96.
van Eldik L., Watterson D. (1979). Characterization of a calcium-modulated protein from transformed chicken fibroblasts. J. Biol. Chem. 254, 10250—10255.
Villar-Palasi C., Wei S. H. (1970). Conversion of glycogen phosphorylase b to a by nonactivated phosphorylase b kinase: An in vitro model of the mechanism of increase in phosphorylase a activity with muscle contraction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 67, 345—350.
Waddell W. J., Bates R. G. (1969). Intracellular pH. Physiol. Rev. 49, 285—336.
Waddell W. J., Butler T. C. (1959). Calculation of intracellular pH from the distribution of DMO. J. Clin. Invest. 38, 720—729.
Waksman A., Rendon A., Cremel G., Pellicone C., de Brugiere J.-F. G. (1977). Intramitochondrial intramembranal reversible translocation of aspartate aminotransferase and malate dehydrogenase through the inner mitochondrial membrane. Biochemistry 16, 4703—4707.
Warburg O. (1925). Uber Milchsaurebildung beim Wachstum. Biochem. Z. 160, 307—311.
Warburg O. (1926a). «Uber den Stoffwechsel der Tumoren». Springer-Verlag, Berlin.
Warburg P. (1926b). Uber die Wirkung von Blausaureathylester auf die Pasteursche Reaktion. Biochem. Z. 172, 432—441.
Warburg O. (1956a). On the origin of cancer cells. Science 123, 309—314.

Warburg O. (1956b). On respiratory impairment in cancer cells—reply. Science **124**, 269—270.
Warburg O., Kubowitz F. (1927). Stoffwechsel wachsender zellen. Biochem. Z. **189**, 242—248.
Warburg O., Posener K., Negelein E. (1924). Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. Biochem. Z. **152**, 309—344.
Watterson D. M., van Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C. (1976). Calcium-dependent regulatory protein of cyclic nucleotide metabolism in normal and transformed chicken embryo fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **73**, 2711—2715.
Weber M. (1973). Hexose transport in normal and Rous sarcoma virus-transformed cells. J. Biol. Chem. **248**, 1978—1982.
Weinhouse S. (1955). Oxidative metabolism of neoplastic tissues. Adv. Cancer Res. **3**, 269—325.
Weinhouse S. (1970). Respiration, glycolysis and enzyme alterations in liver neoplasms. Miami Winter Symp. **2**, 462—480.
Wenner C. (1975). Regulation of energy metabolism in normal and tumor tissues. In «Cancer: A Comprehensive Treatise» (F. F. Becker, ed.), Vol. **3**, pp. 389—403. Plenum, New York.
Wenner C., Hackney J. (1976). Inhibition of $^{86}Rb^{+}$ and $^{22}Na^{+}$efflux of Ehrlich Lettre tumor cells by Ca^{++}. Arch. Biochem. Biophys. **176**, 37—42.
Whitfield J. F., Rixon MacManus J. P., Balk S. D. (1973). Calcium, cAMP, and the control of cell proliferation: A review. In Vitro **8**, 257—292.
Wilt F. H., Mazia D. (1974). The stimulation of cytoplasmic polyadenylation in sea urchin eggs by ammonia. Dev. Biol. **37**, 422—424.
Winkler M. M., Grainger J. C. (1978). Mechanism of action of NH_4Cl and other weak bases in the activation of sea urchin eggs. Nature (London) **273**, 536—538.
Wyatt H. V. (1964). Cations, enzymes and control of cell metabolism. J. Theor. Biol. **6**, 441—470.
Yanagisawa T. (1975). Carbohydrate metabolism and related enzymes. In «The Sea Urchin Embryo» (G. Czihad, ed.), pp. 510—549. Springer-Verlag, Berlin and New York.
Yasumasu I., Asami K., Sholger R., Fujiwara A. (1973). Glycolysis of sea urchin eggs. Rate limiting steps and activation at fertilization. Exp. Cel Res. **80**, 361—496.
Yu J., Steck T. L. (1975). Associations of band 3, the predominant polypeptide of the numan erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. **250**, 9176—9184.
Zeuthen E. (1971). Synchrony in Tetrahymena by heat shocks spaced a normal cell generation apart. Exp. Cell Res. **68**, 49—60.
Zeuthen E. (1978). Cell cycle controls and cell synchrony. J. Supramol. Struct. **52**, 308.
Zieve P. D., Haghshenass M., Krevans J. R. (1967). Intracellular pH of the human lymphocyte. Am. J. Physiol. **212**, 1099—1102.
Zucker R. S., Steinhardt R. A., Winkler M. M. (1978). Intracellular calcium release and the mechanisms of parthenogenetic activation of the sea urchin egg. Dev. Biol. **65**, 285—295.

12

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ НАТРИЙ И РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА. СРАВНЕНИЕ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Томас Б. Пул, Иван Л. Камерон, Нэнси К. Р. Смит и Родни Л. Спаркс

12.1 Введение 362
12.2. Измерение внутриклеточной концентрации элементов методом рентгеновского микроанализа 364
12.2.1. Метод и его обоснование 364
12.2.2. Сравнение концентрации внутриклеточных химических элементов в нормальных и опухолевых клетках 369
12.2.3. Концентрация элементов при обработке клеток гепатоканцерогеном 371
12.3. Внутриклеточная концентрация элементов и деление клеток 372
12.3.1. Сравнение нормальных и опухолевых клеток 372
12.3.2. Внутриклеточные концентрации элементов в 3Т3-клетках мышей BALB/c, достигших конфлюентности 375
12.3.3. Изменение внутриклеточной концентрации элементов при стимуляции покоящихся клеток к вступлению в клеточный цикл 376
12.4. Роль ионов Na в стимуляции роста нормальных и опухолевых клеток 377
12.4.1. Вход ионов Na в качестве инициатора нормальной клеточной пролиферации 378
12.4.2. Na и неопластическая трансформация 378
12.5. Заключение 379
12.6. Указатель литературы 380

12.1. ВВЕДЕНИЕ

Контролируемый рост и конечная реализация различных функций в клетках животных являются результатом избирательных генетических процессов, происходящих в определенной внутриклеточной среде. Любое событие, способное нарушить эту тщательно сбалансированную среду, приводит к изменению природы и скорости макромолекулярных взаимодействий, обязательных для нормального функционирования клетки. Это не новая идея, так как еще в 1905 г. Beebe (1905) обнаружил, что отношение концентрации K к концентрации Na было ниже в эмбриональной и опухолевой тканях, чем в зрелой нормальной ткани животных. Предположение о том, что некоторые свойства внутриклеточной среды могут прямо вовлекаться в клеточную регуляцию, привлекло внимание исследователей и способствова-

ло появлению новых аналитических методов (см. гл. 9—11). Использование этих методов не только позволило дать лучшую оценку регуляторной роли состояния клеточной воды, внутриклеточного pH, цитоплазматической вязкости и т. д., но также способствовало определению различий, существующих между нормальными и трансформированными клетками. Цель этой главы сравнить внутриклеточное содержание щелочного катиона Na в нормальных и трансформированных клетках и обсудить возможность вовлечения этого элемента в регуляцию клеточного роста.

Начиная с конца 1960 г. Cone и соавторы стали развивать теоретически и проверили экспериментально гипотезу о том, что клеточный трансмембранный потенциал (E_m) и, в частности, внутриклеточный уровень Na могут непосредственно вовлекаться в процессы как митогенеза, так и онкогенеза (Cone, 1969, 1971a, 1974; Cone, Tongier, 1971, 1973). Это направление исследований основано на фактах, согласно которым значение величины E_m для некоторых активно пролиферирующих клеточных линий существенно ниже, чем в митотически покоящихся клетках in vivo. Кроме того, имеются данные, позволяющие предположить, что значение величины мембранного потенциала активно пролиферирующих злокачественных клеток гораздо ниже нормальных гомологов. Эти данные наряду с первыми экспериментальными доказательствами позволили Cone сформулировать обобщенную теорию митогенеза/онкогенеза, в основу которой легли соображения о роли мембранного потенциала и концентрации ионов. То, что существенные изменения внутриклеточного содержания Na сопровождают зависимые от мембранного потенциала изменения митотической активности клеток, дало возможность предположить, что уровень внутриклеточного Na более направленно влияет на метаболизм, чем физический трансмембранный потенциал сам по себе (Cone, 1974). Для подтверждения этой гипотезы Cone и Tongier (1971) культивировали синхронизированные клетки CHO в среде, содержащей ионы Na и K, концентрации которых стимулировали сократительный аппарат цитоплазмы при высоких значениях потенциала (от —50 до —90 mV). Основываясь на данных, что активность ионного насоса пролиферирующих CHO-клеток достаточно низкая, авторы заключили, что внутриклеточное отношение Na/K будет такое же, как и в среде. При этих условиях клетки обратимо задерживаются в G_1-фазе клеточного цикла. Поскольку отмечено, что E_m незначительно изменяется в «высокопотенциальной среде» по сравнению с контрольной средой, то митотический покой связывают с внутриклеточными концентрациями ионов. В других экспериментах показано, что добавление трипсина в культуральную среду CHO-клеток, находящихся в логарифмической фазе роста, приводит к трехкратному повышению внутриклеточной концентрации Na и заметному повышению скорости пролиферации, но не влияет на низкое значение основного мембранного потенциала. Вероятно, увеличенная внутриклеточная концентрация Na связана с повышенной митотической активностью. Особенный интерес представляют данные о том, что внутриклеточный уровень Na повышается в активно пролифери-

рующей саркоме по сравнению со зрелой митотически покоящейся нормальной тканью (Cone, 1974). Moseatelli и сотрудники (1979) снижали концентрацию K в культуральной среде фибробластов эмбрионов цыплят с 5 до 0,59 мМ. Это приводило к снижению внутриклеточной концентрации K на 22 % и повышению концентрации Na на 820 % по сравнению с контролем. Однако эти изменения не затрагивают синтез ДНК, о чем свидетельствуют опыты по включению ^{3}H-тимидина. По-видимому, абсолютные концентрации Na незначительно влияют на скорость клеточной пролиферации. Это не означает, что Na может некоим образом стимулировать клетки к митозу. Cone и Cone (1976, 1978) показали, что внесение оубаина или ионофоров в культуральную среду приводит к индукции митозов в зрелых нейронах из центральной нервной системы птиц. Эффективную концентрацию оубаина можно даже снизить при увеличении содержания NaCl в культуральной среде. Из этого следует, что манипуляции, приводящие к повышению внутриклеточного уровня Na, могут стимулировать митозы в покоящейся клеточной популяции.

В последнее время все более становится ясным, что нормальные и трансформированные клетки различаются внутриклеточной концентрацией Na и Na-зависимой активности. Так, Bader (1976) измерил скорость поглощения 2-дезоксиглюкозы нормальными эмбриональными клетками цыпленка и эмбриональными клетками цыпленка, трансформированными вирусом саркомы Рауса штамма Blyan. Скорость поглощения определялась по внеклеточной концентрации Na для нормальных клеток, однако даже при оптимальной внеклеточной концентрации Na нормальные клетки не могут набрать скорость поглощения, характерную для трансформированных клеток. К тому же известно, что трансформированные клетки аккумулируют воду и Na (Otten, 1972). Как отмечал Bader, скорость поглощения экзогенных метаболитов зависит от множества внутриклеточных метаболических процессов и Na может участвовать в общей регуляции клеточного метаболизма.

За последние годы в нескольких лабораториях используют метод рентгеновского микроанализа для измерения внутриклеточной концентрации Na и других элементов в нормальных и трансформированных клетках (Smith et al., 1978; Trump et al., 1979; Cameron et al., 1980в). Без исключений, внутриклеточная концентрация Na существенно повышена в трансформированных клетках по сравнению с нормальными гомологами. В обзоре представлены данные, полученные этим методом.

12.2. ИЗМЕРЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОВСКОГО МИКРОАНАЛИЗА

12.2.1. Метод и его обоснование

Преимущество метода рентгеновского микроанализа как аналитического метода в биологии клетки заключается в том, что из одного анализа могут быть получены количественные данные для многочис-

ленных внутриклеточных элементов. Использование надежных препаративных методов приготовления тканевых срезов наряду с применением соответствующих стандартов позволило нам установить внутриклеточную концентрацию Mg, Na, P, S, Cl, K и часто Ca из расчета на сухую массу (ммоль/кг). Ценность этого метода также в том, что это «морфоаналитический» метод. Мы использовали вторичное возбуждение электронов для идентификации клетки и специфических областей внутри клетки (ядра или цитоплазмы). Поэтому мы гарантированы, что полученные данные представляют специфический клеточный тип или же дискретную зону внутри клетки. Для многих других аналитических методов требуется предварительная гомогенизация или экстракция ткани для получения данных о концентрации элементов. Это, естественно, не проблема, если исследуется один клеточный тип, растущий in vitro, но это крайне нежелательно при измерении концентрации элементов в образцах твердых тканей, трансплантируемых in vivo опухолей. Вероятность того, что данные такого рода представляют средние значения всех клеточных типов (клетки соединительной ткани, компоненты кровеносных сосудов, некротические или дегенерирующие клетки и т. д.), присутствующих в образце в дополнение к интересующему нас типу клеток, не может быть исключена. К тому же, если нужно сравнить концентрацию элементов в дискретных участках внутри клетки, необходимо провести дополнительную их препаративную обработку, например выделение ядер. Влияние такой обработки на артефактное распределение способных к диффузии элементов следует точно установить и экспериментально отрегулировать.

Следует подчеркнуть, что метод рентгеновского микроанализа можно успешно комбинировать с другими методами для получения более точной и полной картины ионного профиля клетки, соблюдая определенные условия. Наибольшим ограничением метода рентгеновского микроанализа является то, что полученные данные выражают общую концентрацию элементов независимо от свободного или связанного их состояния. Следовательно, после сообщения о наших данных применять термин «ион» не верно, если точно не знаешь, в каком состоянии по отношению к общей концентрации находится этот элемент в клетке. По нашему мнению, использование ион-специфических микроэлектродов совместно с рентгеновским микроанализом в исследовании клеточной популяции открывает более информативный подход к пониманию роли различных элементов в регуляции роста.

12.2.1.1. Препаративные методы и анализ с помощью метода рентгеновского микроанализа

Наши методы приготовления срезов тканей для изучения с помощью рентгеновского микроанализа обсуждались более детально ранее (Smith et al., 1978; Cameron et al., 1979, 1980a, b; Pool et al., 1980). Мы применили методы, первоначально разработанные для авторадиографического обнаружения веществ, способных к диффузии

на сухих образцах (Stumpf, Roth, 1966, 1969; Brown et al., 1969). Тканевые срезы площадью 1—2 мм², взятые у животных, умерщвленных посредством цервикальной дислокации, помещали на кончик латунного трубкообразного держателя, используя в качестве смазки тщательно измельченную печень. Латунный стержень с приклеенным кусочком ткани переносили в жидкий пропан, который хранился в бане с жидким азотом. После такого быстрого замораживания образец переносили в криостат с жидким азотом. В криостате поддерживали температуру —30 °С. Процедура от забоя животных до замораживания занимала меньше 60 с. Всякий раз, когда это было возможно, мы использовали свежую поверхность образца, чтобы не анализировать поврежденные клетки. В том случае, если это невозможно, поступали следующим образом: несколько поверхностных срезов блока отбрасывали и лишь затем готовили срезы для рентгеновского микроанализа. Срезы толщиной 4 мкм помещали в криосорбционный аппарат внутри криостата и лифилизировали в течение ночи. В то время как одно отделение криосорбционного аппарата находилось в жидком азоте, камеру с образцами можно было нагреть до комнатной температуры, а затем медленно возвратить атмосферное давление с помощью газообразного азота. Лиофилизированные образцы хранили в вакуумном эксикаторе над сухим кальцием.

Для анализа и получения отпечатков срезы помещали над 1—2-миллиметровым отверстием угольной планшетки диаметром 1 см. Срезы прикрепляли к краям отверстия планшетки, используя небольшое количество смазки. Таким образом, непокрытые и неподдерживающиеся участки срезов анализировали при 15 кV в JEOL JSM35-сканирующем микроскопе, соединенном с ядерным полупроводниковым Si (Li)-рентгеновским детектором. Образцы находились на расстоянии 1,5 см от детектора под углом 40°. Полученные данные обрабатывали с помощью высокоимпульсной системы NS-880 (Tracor Northern, Middleton, Wisconsin). Электронные фотографии использовали для визуального морфологического изучения. Площадь поверхности цитоплазмы для каждой клетки составляла 1,6 мкм² и время реального счета — 100 с. Рентгеновское высокоимпульсное распределение измеряли при энергии 0—10,22 keV с разрешением 20 eV на канал. Tracor Northern Super ML-программа применялась для расшифровки спектра и вычисления сигнала элемента из фона. Фон произвольно выбирали в интервале энергии 4,5—5 keV, при которой соответствующие для каждого элемента сигналы в образцах не появляются. Затем отношение характеристичного сигнала к фону для каждого элемента сравнивали с серией стандартов, содержащих известную массу солей в бычьем сывороточном альбумине. Лиофилизированные 4-микрометровые срезы растворов альбумина готовили и анализировали точно так же, как и тканевые образцы. Подбирали такой состав стандартов, какой был в биологических образцах (приблизительно 20 % сухой массы). Расчет производили по стандартным кривым, опубликованным ранее (Cameron et al., 1979). Концентрацию элементов выражали в ммоль/кг сухой массы.

12.2.1.2. Обоснование метода

Надежность выбранного нами препаративного метода сохранения естественного распределения элементов, способных к диффузии, проверялась (Pool et al., 1980) и обсуждалась (Cameron et al., 1979) ранее более детально. Здесь дается лишь краткое обсуждение надежности метода.

Наш выбор толщины срезов 4 мкм и энергии высокоимпульсного распределения при 15 кV основан на следующих соображениях: глубина проникновения электронов, имеющих энергию 15 кV, в лиофилизированные срезы тканей больше, чем диаметр клетки любого исследованного нами типа. Заметим, что диаметр анализируемых клеток был больше чем 4 мкм. При использовании более тонких срезов требуются более тонкий пучок рентгеновских лучей и более продолжительное время для подсчета импульсов, но увеличивается вариабельность данных. Прямая зависимость между отношением сигнала элемента к фону и концентрацией элементов основана на тех данных, что излучение характеристичного сигнала производится элементами, присутствующими в анализируемом образце. Чтобы подтвердить правильность выбора толщины срезов, составляющей 4 мкм и обеспечивающей надежную количественную оценку отношения сигнала к фону, мы для сравнения исследовали срезы 20 %-ных (м/v) желатиновых блоков толщиной 2 мкм, содержащих известное количество солей. Результаты статистического анализа не показали резких отличий содержания элементов при использовании срезов различной толщины. Отношение сигнала к фону — преимущество при анализе срезов разной толщины, и, следовательно, локальное содержание незначительно влияет на количественное определение элементов.

Скорость замораживания образцов также влияет на определение содержания элементов. Если скорость замораживания ткани низкая, то во внеклеточной жидкости будут образовываться кусочки льда до их формирования внутри клетки. Такое обстоятельство часто приводит к увеличению концентрации электролитов в незамороженном внеклеточном пространстве, вызывая осмотический выход воды из клеток, что ведет к сморщиванию клеток и увеличению внеклеточного пространства (Dörge et al., 1978). Из результатов визуального наблюдения микрофотографий срезов (рисунок, см. вклейку) следует, что между клетками нет зазоров и внеклеточное пространство не увеличено. Эти наблюдения можно интерпретировать как указание на отсутствие сморщивания клеток и тканей в образцах или самого незначительного его наличия. Возможно, что все тканевые компартменты сжаты одинаково, однако такое артефактное сморщивание клеток не приводит к изменению отношения сигнала к фону или к отрицательному влиянию на количественную оценку наших данных.

На рисунке 1 четко видны гранулы в ядре. Эту гранулярность связывают с образованием кристаллов льда. Образование кристаллов такого рода не влияет на перераспределение преимущественно

одного какого-то элемента (как обнаружили на стандартных срезах альбумина Pool и сотрудники, 1980), если область излучения находилась полностью в пределах границ отдельного кристалла льда. По этой причине размер кристаллов льда определяет минимальное пространственное разрешение, достигаемое нашим методом, и, следовательно, анализируемая область будет всегда больше, чем размер самых больших кристаллов льда. Основываясь на этих фактах, а также на данных авторадиографии о локализации растворимых веществ, полученных с помощью тех же препаративных методов (Stumpf, Roth, 1966, 1969; Brown et al., 1969), мы можем с уверенностью заключить, что в приготовленных таким образом препаратах происходит незначительное перемещение элементов.

Остается еще вопрос о том, происходит ли перераспределение элементов за период времени от умерщвления животных до замораживания ткани. Как указывалось выше, это время составляет менее 1 мин, однако, как только прекращается снабжение кровью образца, напряжение кислорода резко падает. Чтобы проверить, влияет ли этот факт на транслокацию элементов, мы сравнили внутриклеточные концентрации элементов в гепатоцитах двух крыс. Образцы клеток одного животного готовили, как описано выше. Приготовление образца клеток другого животного было следующим: целую долю печени сразу же замораживали в жидком пропане. При этом снабжение кровью оставалось интактным. Затем быстро вырезали небольшие кусочки ткани, прикрепляли их к латунному стержню и лиофилизировали. Срезы из двух образцов ткани анализировали в идентичных условиях и полученные данные статистически обрабатывали. Различий концентрации элементов в гепатоцитах, приготовленных двумя разными методами (Pool et al., 1980), не обнаружено. В связи с этим мы заключили, что в течение непродолжительного времени, требующегося для взятия ткани и ее замораживания, не происходит артефактного перераспределения элементов, способных к диффузии.

12.2.1.3. Морфологическая целостность образцов

Для приготовления и анализа образцов использовали методы, предотвращающие перемещение веществ, способных к диффузии, и давали надежные результаты о внутриклеточной концентрации элементов. Мы выбрали для образцов оптимальные условия, способствующие этой цели, и не пользовались их химической фиксацией и покрытием металлами. На рисунке (см. вклейку) представлена электронная микрофотография нормальной двенадцатиперстной кишки мышей, приготовленной для рентгеновского микроанализа, описанного в этой главе. Хотя мы не пользовались фиксацией и не покрывали ткань металлами, морфология среза оказалась качественно пригодной для идентификации разных типов клеток и дала даже некоторую внутриклеточную характеристику при малом увеличении. Гранулы больших клеток Панетта, находящихся у основания крипт, а также митотический хроматин можно четко различить от

интерфазных ядер энтероцитов. При увеличениях, которые используются в этом методе, можно разграничить ядрышки, ядерные мембраны, секреторные гранулы и клеточные мембраны. Мы способны также отличать кровеносные сосуды и использовать их затем как маркеры, если анализ проводили на трансформированных клетках или на срезах солидных опухолей. Анализируя лишь клетки, находящиеся в пределах ограниченного расстояния от кровеносных сосудов, мы значительно снижали вероятность включения в получаемые результаты значений, относящихся к некротическим клеткам.

12.2.2. Сравнение концентрации внутриклеточных химических элементов в нормальных и опухолевых клетках

Мы измеряли внутриклеточную концентрацию Na, Mg, P, S, Cl и K в ядрах и цитоплазме клеток четырех перевиваемых опухолей. Данные этих исследований представлены в табл. 1. В каждом случае нормальный гомолог клеток каждого типа опухоли анализировали и статистически сравнивали с опухолевыми клетками. Сравнение производили следующим образом: опухолевые клетки гепатомы Морриса сравнивали с нормальными гепатоцитами тех же крыс; опухолевые клетки гепатомы мышей — с нормальными гепатоцитами животных-опухоленосителей и нормальными гепатоцитами животных без опухолей; клетки аденокарциномы молочной железы мышей C3H — с нормальными эпителиальными клетками лактирующей молочной железы мышей; клетки аденокарциномы молочной железы 13762NF крыс — с эпителиальными клетками лактирующей молочной железы крыс. Для того, чтобы определить, существует ли достоверное различие концентрации элементов в ядре и в цитоплазме, проведен статистический анализ для каждого элемента. Поскольку достоверных отличий не обнаружено, то в таблицу внесены данные лишь по определению концентрации элементов в цитоплазме. Изучение распределения Na, Ca и других элементов между ядром и цитоплазмой было предметом многих работ, в каждой из которых применяли методы выделения ядер (см. обзор Siebert, 1972). В этих работах высказано предположение, что ядро является местом аккумуляции Na. Наши данные и статистический анализ не могут подтвердить это предположение и свидетельствуют о том, что Na и другие элементы распределены равномерно по всей клетке. Кроме того, эти данные отражают общую концентрацию элементов и не означают, что коэффициент активности различных ионов будет одинаковым во всех компартментах клетки. Понимание расхождений наших данных, полученных с помощью метода рентгеновского микроанализа и данных других авторов, выделявших ядра в условиях своих аналитических исследований, дает недавняя работа Jones и сотрудников (1979). В ней представлены доказательства, что процедура выделения ядер вызывает перераспределение элементов, в результате которого получаются ошибочно высокие значения концентрации Na и Ca для ядра.

Таблица 1. **Сравнение концентрации элементов (ммоль/кг сухой массы) в опухолевых клетках и их нормальных (неопухолевых) гомологах** [1]

Вид животных и тип клеток	Внутриклеточная локализация	Число изученных клеток	Na	Mg	P	S	Cl	K	Литература
Крыса									
гепатоциты	Цитоплазма	10	102±12	38±7	321±25	138±7	137±6	301±15	Cameron et al. (1979)
гепатома Морриса 7777	Цитоплазма	10	192±30	30±4	438±27	165±16	253±18	395±38	
Мышь									
нормальные гепатоциты	Цитоплазма	20	137±8	51±3	420±13	196±5	135±5	304±8	Smith et al. (1978)
гепатоциты животного-опухоленосителя	Цитоплазма	20	99±15	37±3	466±16	246±7	123±11	362±9	
гепатома Н6	Цитоплазма	20	355±52	36±3	469±21	230±11	316±19	366±22	То же
Мышь									
эпителий нормально лактирующей молочной железы	Базальная цитоплазма	10	204±21	37±6	538±26	129±6	166±5	327±8	Cameron et al. (1980в)
аденокарцинома молочной железы С3Н	Цитоплазма	5	643±28	54±9	699±16	194±4	362±10	278±9	То же
Крыса									
нормальная лактирующая молочная железа	Апикальная цитоплазма	7	138±10	53±4	631±16	113±4	158±7	399±13	Sparks и Cameron (1980)
	Базальная цитоплазма	7	132±8	48±3	607±3	110±7	162±7	393±7	
аденокарцинома молочной железы 13762NF	Цитоплазма	10	566±17	47±5	513±19	255±19	334±16	355±10	То же
Статистический анализ	Значение F		27,5[2]	0,006[3]	0,569[3]	2,7[3]	100[2]	0,179[3]	
	Доверительный интервал (d)		125(0,05) 172(0,01) 234(0,001)				39(0,05) 54(0,01) 73(0,001)		

Примечания: [1] данные Cameron и др. (1980б); [2] значение F достоверно при $p < 0{,}001$; [3] недостоверные значения F; [4] доверительный интервал между средними значениями в каждой колонке: средние значения достоверно отличаются при указанной степени достоверности (в круглых скобках).

Как видно из статистических данных, включенных в табл. 1, достоверных отличий концентрации Mg, P, S или K в опухолевых клетках и нормальных их гомологах не обнаружено. Высокодостоверные значения F были получены при сравнении концентрации Na и Cl опухолевых и нормальных клеток ($p < 0{,}001$). Повышение концентрации Na в опухолевых клетках по сравнению с нормальными составляет от 77 до 33 %. Следует заметить, что наименьшее повышение концентрации Na в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками составило 77 %. Аналогично минимальное увеличение концентрации Cl было 83 и самое высокое — 236 %. Из статистической оценки концентраций Na и Cl в этих и других клетках определено, что Na и Cl обмениваются не на молярной основе 1 : 1, а, по-видимому, 1 : 2 или 1 : 3 (Cl : Na) (Cameron et al., 1980b).

12.2.3. Концентрация элементов при обработке клеток гепатоканцерогеном

Заметный интерес представляют данные об увеличении концентрации Na и Cl в истинно опухолевых клетках по сравнению с их нормальными гомологами, но в лучшем случае это было описание двух различных физиологических состояний. Разграничение причины и эффекта является также постоянной и всегда существующей необычайной трудностью в биологии опухолевой клетки. С целью дать более полный и окончательный ответ об относительной роли внутриклеточных элементов в неопластической трансформации мы решили выяснить, можно ли установить достоверное повышение концентрации Na и Cl в гепатоцитах животных, обработанных в течение короткого периода времени гепатоканцерогеном. Короткий период времени экспозиции с канцерогеном дает гарантию, что мы анализируем не истинно трансформированные клетки. Многие гепатомы, как известно, продуцируют α-фетопротеин — белок, который в норме синтезируется лишь в период раннего развития и циркулирующая в крови концентрация которого падает до необнаруживаемого уровня вскоре после рождения. В качестве гепатоканцерогена выбран гидразинсульфат (Toth, 1975), который вводили крысам из расчета 15 мг на 1 кг массы животного 2 раза в день в течение 5 дней. В конце этого периода α-фетопротеин можно легко обнаружить в сыворотке крови крыс с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Это означает, что за такое время клетки печени подверглись действию канцерогена достаточно для стимуляции синтеза фетальных белков. Как видно из данных табл. 2, внутриклеточная концентрация Na и Cl в гепатоцитах животных, обработанных гидразинсульфатом, направлена в сторону истинно трансформированных клеток (гепатома Морриса 7777). Из этого мы заключаем, что повышение внутриклеточной концентрации Na и Cl характерно не только для истинно трансформированных клеток, но и в какой-то мере для процессов неопластической трансформации.

Таблица 2. **Влияние гепатоканцерогена гидразинсульфата на содержание элементов в цитоплазме гепатоцитов крыс (ммоль/кг сухой массы)[1, 2]**

Объект	Na	Cl	Mg	P	K	S
Гепатоциты крыс B	102 (12)	141 (5)	38 (7)	321 (25)	301 (15)	138 (7)
Гепатоциты крыс B, обработанные гидразинсульфатом[3]	131 (6)	95 (2)	50 (2)	386 (8)	261 (5)	180 (2)
Трансформированные клетки гепатомы Морриса 7777	192 (30)	242 (18)	30 (4)	438 (27)	295 (38)	165 (16)
Статистический анализ						
значение F	5,24	32,13	2,59	3,02	5,40	2,33
достоверность	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05	<0,001	Недостов.
Доверительный интервал между средними значениями[4]; степень достоверности						
0,001	85[4]	64[4]	21[4]	126[4]	126[4]	56[4]
0,05	49	37	12	73	73	32

Примечания: [1] данные Cameron и Smith (1980); [2] каждое значение получено из измерений в 10 клетках ± m — в круглых скобках; [3] 15 мг/кг массы тела животных, 2 раза в день в течение 5 дней; [4] доверительный интервал между средними в каждом ряду; средние в каждом ряду существенно отличаются при указанной степени достоверности.

12.3. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК

12.3.1. Сравнение нормальных и опухолевых клеток

В разделе 2 этой главы (пункт 1 и 2) обобщены данные сравнительного анализа четырех опухолевых клеточных типов и их нормальных гомологов, а также данные изучения клеток, подвергшихся действию известного гепатоканцерогена. Обобщение дает возможность предположить, что повышенная концентрация Na и Cl может быть характерным признаком трансформированных клеток. Не ясно, существует ли какое-то единственное свойство трансформированных клеток, с которым может быть связана эта повышенная концентрация. Так как Cone и его сотрудники для нескольких клеточных систем представили доказательство того, что повышенная внутриклеточная концентрация Na может быть митогенна (раздел 1), мы решили сравнить средние значения концентрации элементов различных групп клеток по их пролиферативной способности. В сущности мы задаем вопрос: присуще ли вообще повышение концентрации Na и Cl, так же как и других элементов, только опухолевым клеткам или делящимся тоже. С этой целью мы классифицировали концентрацию эле-

ментов, которую определяли с помощью рентгеновского микроанализа у большого числа клеток на следующие четыре группы: 1-я — неопухолевые клеточные типы, т. е. нормальные гомологи опухолевых клеток (в эту группу включены также клетки, представленные в табл. 1). 2-я — опухолевые клеточные типы, включая также представленные в табл. 1. 3-я — быстро делящиеся нормальные клетки (в эту группу отнесены клетки, продолжительность клеточного цикла которых составляет 7 дней или меньше (Cameron, 1971) или митотический индекс составляет 1,5 % или выше). 4-я — медленно пролиферирующие клетки, не удовлетворяющие критериям, установленным для группы 3. В 3-ю группу включены следующие клеточные типы: интерфазные клетки крипт двенадцатиперстной кишки, миоциты сердца 2- и 4-дневных мышей, клетки эпителия кишечника и коры тимуса крыс. К 4-й группе относятся эпителий лактирующей молочной железы, мозговое вещество вилочковой железы, гладкие мышцы двенадцатиперстной кишки, ацинарные клетки поджелудочной железы и нормальные гепатоциты крыс с опухолью, эпителей лактирующей молочной железы, миоциты сердца 16- и 32-дневных мышей, ацинарные клетки поджелудочной железы, промежуточный эпителий мочевого пузыря, гепатоциты нормальных мышей и гепатоциты мышей с трансплантируемой гепатомой. В табл. 3 приведены данные статистического сравнения средних значений концентрации элементов для этих четырех групп. Необходимо отметить, что для каждого класса клеточных популяций был проведен статистический анализ ядерно-цитоплазматических отношений концентраций элементов (Cameron et al., 1980a). Ни в одной из этих четырех групп клеточных типов не обнаружены статистические различия концентрации элементов в ядре и цитоплазме. При сравнении опухолевых клеточных типов и их неопухолевых гомологов (2-й группы с 1-й в табл. 3) оказалось, что концентрация Na и Cl значительно и достоверно повышена в опухолевых клетках ($p < 0,001$). Различия значений концентрации других элементов двух клеточных типов не обнаружены. Эти анализы являются продолжением работ, результаты которых представлены в табл. 1. При сравнении клеточных типов 3-й и 4-й групп оказалось, что концентрация Na, Cl, Mg, P и K существенно повышена в клетках быстро пролиферирующей популяции по сравнению с клетками медленно делящихся типов. Хотя концентрация Na и Cl значительнее повышена в клетках быстро делящихся популяций, размер этого повышения не настолько высок, как в опухолевых клетках. Если же опухолевые клетки сравнить с быстро делящимися нормальными клетками (2-я группа по сравнению с 3-й), то концентрация Na и Cl выше в опухолевых клетках, в то время как концентрация P, Mg, K выше в быстро делящихся нормальных клетках. Следовательно, наши данные показывают, что увеличенная внутриклеточная концентрация Na связана с митогенезом. Однако более высокая концентрация Na в трансформированных клетках дает основание предположить, что повышенная концентрация Na имеет более тесное отношение к онкогенезу, чем к митогенезу. Эти выводы можно распространить и на концентрацию Cl, но тот известный факт,

Таблица 3. **Статистическое сравнение отличий концентрации элементов в опухолевых и неопухолевых клетках, а также в быстро и медленно делящихся клеточных типах[1, 2]**

Номер группы, классификация клеточной популяции	n	Na	M;	P	S	Cl	K
1-я, неопухолевые клетки	11	138±11	44±3	495±28	173±17	142±9	339±13
2-я, опухолевые клетки	8	451±6	44±4	527±30	215±17	329±17	348±13
Значение p, отличие между 1-й и 2-й группой		<0,001	Недостов.	Недостов.	Недостов.	<0,001	Недостов.
3-я, быстро пролиферирующие клетки[3]	9	196±12	63±3	626±42	242±30	206±8	549±15
4-я, медленно пролиферирующие клетки	21	140±8	50±3	515±30	213±22	159±8	389±21
Значение p (отличие между 3-й и 4-й группой)		<0,001	<0,005	<0,1	Недостов.	<0,001	<0,001
Значение p (отличие между 2-й и 3-й группой)		<0,005	<0,005	<0,1	То же	<0,001	<0,001

Примечания: [1] данные Cameron et al., (1980b); [2] средняя концентрация (ммоль/кг сухой массы) ± m; [3] за быстро делящиеся клеточные популяции приняты клеточные популяции с продолжительностью клеточного цикла 7 дней или менее (Cameron, 1971), или с митотическим индексом 1,5 % и выше (C. B. Handbook).

что Cl следует по электрохимическому градиенту Na при различных условиях, позволяет предположить роль Na как возможного фактора митогенеза/онкогенеза.

12.3.2. Внутриклеточные концентрации элементов в 3T3-клетках мышей BALB/c, достигших конфлюентности

Если увеличенная внутриклеточная концентрация Na связана с митотической активностью, можно предположить, что концентрация Na будет снижаться в клетках, вступивших в митотически покоящееся состояние. Для подтверждения этой гипотезы требуется модельная система, в которой митотический индекс гомогенной популяции клеток был бы высоким в одной точке и приближался бы к нулю в другой. С этой целью Pool и сотрудники (1979) применили метод рентгеновского микроанализа для определения внутриклеточной концентрации элементов в 3T3-фибробластах мышей BALB/c в течение раннего и среднего периода логарифмической фазы роста, а также после того, как плотность популяции достигла насыщения. В течение ранней логарифмической фазы плотность популяции на 1 $см^2$ площади роста составляла $1{,}5 \times 10^4$ клеток, в течение средней — $3{,}8 \times 10^4$, а при достижении конфлюентности — $7{,}6 \times 10^4$. Митотический индекс составил 4 % для обоих конфлюентных состояний и 0 % для конфлюентных культур, в то время как индекс метки после 45 мин экспозиции с ^{3}H-тимидином составил примерно 50 % в субконфлюентной культуре и лишь 2 % в конфлюентной. Концентрация Na, P, K, S, Mg и Cl линейно снижается с увеличением плотности клеток, в то время как падение внутриклеточной концентрации Na статистически недостоверно. Последняя в конфлюентной культуре статистически ниже, чем в обоих исследованиях субконфлюентных культур. Следует отметить, что внутриклеточная концентрация Na значительно больше снижается, если митотический индекс популяции равен 0 и индекс метки составляет лишь 2 %. Параллельное с митотическим индексом и индексом метки повышение только концентрации Na позволяет заключить, что внутриклеточная концентрация этого катиона может быть действительно связана с нормальной митотической регуляцией. Примечательно, что в отличие от Na концентрация Cl достоверно снижается в период средней логарифмической фазы роста клеток.

Необходимо подчеркнуть, что 3T3-клетки выбраны для исследования потому, что их митотическая активность синхронно прекращается при насыщении плотности клеток. Из обсуждений, представленных в гл. 2, следует, что 3T3-фибробласты, по-видимому, не «нормальные» клетки. Осторожная интерпретация этих данных позволяет заключить, что внутриклеточное содержание Na связано с митозом. Не ясно, является ли этот признак специфическим для нормальных или опухолевых клеток или присущ обоим типам клеток. In vivo также изучали изменения внутриклеточной концентрации элементов при переходе клеток из митотически активного к митотически покоящемуся состоянию. Dykes и сотрудники (1979)

использовали рентгеновский микроанализ для измерения внутриклеточной концентрации элементов в миоцитах сердца здоровых и неонатальных мышей. Авторадиографические исследования показали, что пролиферативная активность мышечных клеток сердца мышей и крыс бывает высокой лишь в короткий период времени после рождения, а затем быстро падает (Klinge, Stocker, 1968; Cameron, неопубликованные результаты наблюдения) и прекращается через 2 мес после рождения. Показано незначительное снижение с возрастом концентрации Na, K, P, Cl, в то время как концентрация S существенно возрастает. Таким образом, в митотическую регуляцию нормальных клеток вовлекается множество элементов.

12.3.3. Изменение внутриклеточной концентрации элементов при стимуляции покоящихся клеток к вступлению в клеточный цикл

Если внутриклеточная концентрация Na связана с митогенезом, то возникает вопрос: «Значительно ли повышается внутриклеточная концентрация Na в клетках, стимулированных к делению, по сравнению с нестимулированными митотически покоящимися клетками»? Cameron и сотрудники (1980a) применили рентгеновский микроанализ для измерения внутриклеточной концентрации элементов в базальном слое эпителиальных клеток влагалища овариэктомированных нестимулированных крыс и в тех же клетках самок, которым вводили эстрадиол. Овариэктомия приводит к подавлению пролиферативной активности в базальном слое, в то время как введение эстрадиола специфически стимулирует эти клетки к делению. Первые митозы обнаружены через 24 ч после введения эстрадиола; определение элементов проводили через 2, 17 и 24 ч после инъекции. Получены интересные данные об изменениях концентрации различных элементов, которые могут быть связаны с митотической стимуляцией (Cameron et al., 1980a, b). Что касается Na, то в последних работах обнаружено более заметное его концентрационное различие, чем это было установлено ранее. В табл. 4 суммированы данные и приведен статический анализ внутриклеточной концентрации Na, которая значительно падает через 2 и 17 ч после инъекции, но, оставаясь сравнительно высокой, все же через 24 ч снижается по сравнению с внутриклеточной концентрацией у нестимулированных животных. Вероятно, не совсем обоснованно, но можно сделать несколько следующих из результатов этой работы выводов: во-первых, абсолютная внутриклеточная концентрация Na не связана с митотической стимуляцией нормальных клеток; во-вторых, нестимулированные клетки наращивают концентрацию Na в цитоплазме, что благоприятно для митогенеза, тем не менее требуется все же экзогенный сигнал (эстроген) для инициации стимуляции; в-третьих, более важным в митотической регуляции является не реальная концентрация Na, а состояние Na (связанный, ионизированный или адсорбированный). Естественно, эти данные не позволяют отдать предпочтение какому-то одному объяснению. К тому же альтернативные интерпретации, приведенные выше, не исключают одна другую.

Таблица 4. **Изменение содержания Na в эпителии влагалища после стимуляции эстрадиолом[1, 2]**

Время после введения экстрадиола (часы)	Количество клеток, взятых для измерения	Na
0 (контроль)	20	574±15
2	10	358±14
17	21	285±24
24	19	418±20
Статистический анализ отклонений:		
значение F		40,2
достоверность p		<0,001
Доверительный интервал между средними значениями[3]:		
степень достоверности p		
<0,001		105[c]
<0,01		81
<0,05		61

Примечания: [1] — данные Cameron и сотрудники (1980a); [2] выражено в ммоль/кг сухой массы (M ± m); [3] доверительный интервал между средними в каждой колонке. Средние в каждой колонке существенно различаются при указанной степени достоверности.

12.4. РОЛЬ ИОНОВ Na, В СТИМУЛЯЦИИ РОСТА НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Так как основным назначением этой книги является определение и сравнение различий, возможно, существующих между нормальными и трансформированными клетками, следующий раздел будет посвящен обсуждению различий, обнаруженных с помощью рентгеновского микроанализа, между нормальными и опухолевыми клетками, в частности внутриклеточной концентрации Na. Это вовсе не означает, что другие элементы не имеют непосредственного отношения к митогенным и/или онкогенным процессам. Действительно, выполнено множество тщательных исследований, установивших важную роль других катионов в регуляции роста (например, Ca, Mg и K). Однако в этом разделе не будут обсуждаться данные о внутриклеточной концентрации Ca. Это обусловлено тем, что при использовании метода рентгеновского микроанализа концентрация находится на пределе чувствительности метода. Из новых и более поздних данных литературы четко прослеживается роль Ca в прямой регуляции пролиферации нормальных клеток. Кроме того, необходимость Ca для стимуляции роста, по-видимому, снижается при неопластической трансформации нормальных клеток. В этом разделе вкратце будет обсуждена регуляторная роль Ca в связи с Na, а читателям предлагаем обратиться к работам Balk et al. (1979), Rubin (1977), Hazelton et al. (1979), Rozengurt (1979) и Whitfield et al. (1979), в которых более обстоятельно обсуждена роль Ca в стимуляции роста. Роль Mg также детально рассмотрена Rubin (1977), Rubin et al. (1979) и Moscatelli et al. (1979). Для более полного ознакомления можно обратиться к Annals

of the New York Academy of Science (т. 339, 1980), исчерпывающие данные о регуляции роста посредством ионного транспорта в работе Koch и Leffert (1979a).

12.4.1. Вход ионов Na в качестве инициатора нормальной клеточной пролиферации

Ряд сообщений лаборатории молекулярной и клеточной биологии при Salk Institute for Biological Studies представили убедительные доказательства того, что для инициации пролиферации в культивируемых гепатоцитах крыс требуется резкое увеличение входа Na (Koch, Leffert, 1979b; Leffert и Koch, 1980a, b; Leffert et al., 1979). Многое для понимания роли входа Na в клетки получено при использовании амилорида. Амилорид (Merck, Sharp и Dohme) — N-амидино-3,5-диамино-6-хлорпиразинкабоксамид (Glitzer, Steelman, 1966) специфический ингибитор Na-входа (Salako, Smith, 1970). Используя это вещество при исследовании первичной культуры клеток печени, Koch и Leffert (1979b) установили, что стимуляция пролиферации обратимо блокируется 0,02 мМ концентрацией амилорида, соответствующей LD_{50}. Аналогичный эффект получен in vivo при действии на регенерирующую печень LD_{50}, составляющей 25 мг на 1 кг массы тела животного. Торможение пререпликативных событий совпадает с действием амилорида в этой системе.

На основании результатов этой работы, а также данных других авторов (Whitfield et al., 1980; Leffert, Koch, 1980b) предположили, что для пролиферации нормальных гепатоцитов необходимы два ионных сигнала. Первый сигнал — измененный поток одновалентных катионов, а второй — поток Ca и цАМФ. Начальное изменение потока моновалентных катионов специфически связано со входом Na, что подтверждено результатами экспериментов, проведенных с использованием блокады амилоридом. Резкий вход Na требуется не только для инициации пролиферации в нормальных гепатоцитах, но и для инициации синтеза ДНК в яйцах морского ежа после их оплодотворения и в культуре мышиных фибробластов после обработки их сывороточными факторами (Epel, 1980; Rozengurt, Mendoza, 1980). Следует подчеркнуть, что и вход Na и транспорт Ca, сопряженные с образованием цАМФ, необходимы для инициации синтеза ДНК (Koch, Leffert, 1979a). На этой модели вход Na — ранний, возможно, начальный митогенный сигнал.

12.4.2. Na и неопластическая трансформация

Какие события ответственны за измеримое повышение внутриклеточной концентрации Na, обнаруживаемое в трансформированных клетках? Shen и сотрудники (1978) связывают изменение транспорта Na с неопластической трансформацией эпителия молочной железы мышей. Авторы измеряли проницаемость апикальной мембраны клеток первичной культуры молочной железы мышей в середине беременности, а также при пренеопластическом и неопластическом состояни-

ях. Мембранный потенциал неопластических клеток зависит от ионов Na больше, чем мембранный потенциал их нормальных или пренеопластических гомологов. Далее, интерес представляют данные, свидетельствующие о том, что 10^{-5} М амилорида вызывают значительную гиперполяризацию мембран опухолевых клеток C3H мышей BALB/c и не влияют на мембранный потенциал пренеопластических клеток или клеток животных на средних сроках беременности. Это означает, что при неопластической трансформации повышается и проницаемость мембран для Na, и активность Na, К-АТФазы. Принимая во внимание, что повышенная проницаемость мембран для Na является одной из общих черт трансформированного состояния, а усиленный поток Na или увеличенная внутриклеточная концентрация его требуется для митогенеза, можно было бы использовать это для избирательного подавления пролиферации опухолевых клеток. Поэтому Sparks и Cameron (1980) проверили влияние амилорида на пролиферацию нормальных и трансформированных клеток как in vivo, так и in vitro. Установлено, что при введении амилорида каждые 8 ч в течение 104 ч (доза — мкг/г массы тела) A/J-мышам с перевивной гепатомой H6 значительно подавляется опухолевый рост по сравнению с животными, которым вводили амилорид из расчета 0,1 мкг на 1 г массы тела или физиологический раствор. К тому же, митотический индекс в клетках гепатомы мышей, получавших высокие дозы амилорида, был значительно ниже по сравнению с опухолевыми клетками контрольных животных. Результаты обследования клеток крипт двенадцатиперстной кишки не показали существенного снижения митотического индекса в результате действия амилорида. Следовательно, in vivo амилорид вызывает снижение пролиферации лишь опухолевых клеток, но не нормальных клеток. Результаты предварительных экспериментов показывают, что in vitro существует, по крайней мере, временное торможение амилоридом пролиферации в клетках гепатомы H6 и клетках NQT1 (химически трансформированные 3Т3-клетки). Sparks (неопубликованные данные) измерял внутриклеточную концентрацию Na с помощью рентгеновского микроанализа в клетках гепатомы контрольных животных и мышей, которым вводили амилорид. Установлено, что концентрация Na снижается на 28 % в клетках опухолей животных под воздействием амилорида по сравнению с опухолевыми клетками животных, которым вводили физиологический раствор. Эти, хотя и предварительные, данные согласуются с концентрацией, что Na является митогенным сигналом и что между нормальными и трансформированными клетками существует фундаментальное различие, заключающееся в мембранной регуляции Na.

12.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из наших измерений внутриклеточной концентрации элементов в нормальных и опухолевых клетках с помощью рентгеновского микроанализа можно заключить, что увеличенный уровень Na^+ связан с высокой скоростью митозов, а его содержание значительно выше в трансформированных клетках. К тому же концентрация Cl

существенно повышена в делящихся популяциях клеток по сравнению с митотически покоящимися клетками. Митотическая активность в неопухолевых клеточных популяциях также связана с увеличенным уровнем K^+ и Mg^{++} (см. Cameron et al., 1980a, для детального обсуждения); этот характерный признак нормальных клеток утрачивается в трансформированных.

При обработке нормальных и трансформированных клеток амилоридом обнаружено, что подавление Na^+-входа может ингибировать преимущественно пролиферацию опухолевых клеток in vivo. Кроме того, наблюдается существенное снижение внутриклеточной концентрации Na^+ в опухолевых клетках, взятых от животных, которым вводили амилорид, по сравнению с опухолевыми клетками, взятыми от животных, получавших физиологический раствор.

Из результатов нашей работы, связанной с измерением химических элементов в эпителиальных клетках, стимулированных к вступлению в клеточный цикл, мы заключаем, что регуляторным фактором в митогенезе является не абсолютная внутриклеточная концентрация Na, а скорее всего скорость входа Na в клетки. Это, по крайней мере, существенно для нормальных пролиферирующих клеток. Для нас очевидно, что существует фундаментальное различие между регуляцией внутриклеточного Na в нормальных и трансформированных клетках. Мы надеемся, что это различие можно будет использовать для избирательного терапевтического воздействия на раковые клетки. Наши предварительные результаты являются обнадеживающими, и исследования в этом плане продолжаются.

12.6. УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

Bader J. P. (1976). Sodium: A regulator of glucose uptake in virus-transformed and non-transformed cells. J. Cell. Physiol. 89, 677—682.

Balk S. D., Poliment P. I., Hook B. S. (1979). Proliferation of Rous sarcoma virus-infected, but not of normal chicken fibroblasts in a medium of reduced calcium and magnesium concentration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 3913—3916.

Beebe S. P. (1905). The chemistry of malignant growths. II. The inorganic constituents of tumors. Am. J. Physiol. 12, 167—172.

Brown D. A., Stumpf W. E., Roth L. J. (1969). Localization of radioactive labelled extracellular fluid indicators in nervous tissue by autoradiography. J. Cell. Sci. 4, 265—288.

Cameron I. L. (1971). Cell proliferation and renewal in the mammalian body. In «Cellular and Molecular Renewal in the Mammalian Body» (I. L. Cameron and J. D. Thrasher, eds.), pp. 45—85. Academic Press, New York.

Cameron I. L., Smith N. K. R. (1980). Energy dispersive x-ray microanalysis of the concentration of elements in relation to cell reproduction in normal and in cancer cells. Scanning Electron Microsc. 2, 463—474.

Cameron I. L., Pool T. B., Smith N. K. R. (1979). An x-ray microanalysis survey of the concentration of elements in the cytoplasm of different mammalian cell types. J. Cell. Physiol. 101, 493—502.

Cameron I. L., Pool T. B., Smith N. K. R. (1980a). Intracellular concentration of potassium and other elements in vaginal epithelial cells stimulated by estradiol administration. J. Cell. Physiol. (in press).

Cameron I. L., Smith N. K. R., Pool T. B., Sparks R. L. (1980b). Intracellular concentration of sodium and other elements as relaed to mitogenesis and oncogenesis in vivo. Cancer Res. 40, 1493—1500.

Cone C. D., Jr. (1969). Electroosmotic interactions accompanying mitosis initiations in sarcoma cells in vitro. Trans. N. Y. Acad. Sci. 31, 404—427.
Cone C. D., Jr. (1971a). Maintenance of mitotic homeostasis in somatic cell populations. J. Theor. Biol. 30, 183—194.
Cone C. D., Jr. (1971b). Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. J. Theor. Biol. 30, 151—181.
Cone C. D., Jr. (1974). The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 238, 420—435.
Cone C. D., Jr., Cone C. M. (1976). Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. Science, 192, 155—158.
Cone C. D., Jr., Cone C. M. (1978). Evidence of normal mitosis with complete cytokinesis in central nervous system neurons during sustained depolarization with ouabain. Exp. Neurol. 60, 41—55.
Cone C. D., Jr., Tongier M., Jr. (1971). Control of somatic cell mitosis by simulated changes in the transmembrane potential level. Oncology 25, 168—182.
Cone C. D., Jr., Tongier M., Jr. (1973). Contact inhibition of division: Involvement of the electrical transmembrane potential. J. Cell. Physiol. 82, 373—386.
Dorge A., Rick R., Gehring K., Thurae K. (1978). Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative x-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues. Pfluegers Arch. 373, 85—97.
Dykes S. G., Cameron I. L., Smith N. K. R. (1979). Electron probe microanalysis of element composition of mouse cardiac myocytes during post-natal maturation. J. Cell. Physiol. 100, 305—310.
Epel D. (1980). Ionic triggers in the fertilization of sea urchin eggs. Ann. N. Y. Acad. Sci. 339, 74—85.
Glitzer M. S., Steelman S. L. (1966). N-Amino-3,5-diamino-6'-chloropyrazinecarboxamide : An active diuretic in the carboxamide series. Nature (London) 212, 191—193.
Hazelton B., Mitchell B., Tupper J. (1979). Calcium, magnesium, and growth control in the WI-38 human fibroblast cell. J. Cell. Biol. 83, 487—498.
Jones R. T., Johnson R. T., Gupta B. L., Hall T. A. (1979). The quantitative measurement of electrolyte elements in nuclei of maturing erythrocytes of chick embryo using electron-probe x-ray microanalysis. J. Cell Sci. 35, 67—85.
Klinge O., Stocker E. (1968). Die DNS-Synthese in Rattenherzen als Funktion das Lebensalters. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidine. Experientia 24, 269.
Koch K. S., Leffert H. L. (1979a). Ionic landmarks along the mitogenic route. Nature (London) 279, 104—105.
Koch K. S., Leffert H. L. (1979b). Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. Cell. 18, 153—163.
Leffert H. L., Koch K. S. (1980a). Ionic events at the membrane initiate rat liver regeneration. Ann. N. Y. Acad. Sci. 339, 201—215.
Leffert H. L., Koch K. S. (1980b). Two ionic signals as prominent regulators of liver regeneration. Front. Sci. Liver (in press).
Leffert H. L., Koch K. S., Moran T., Rubalcava B. (1979). Hormonal control of rat liver regeneration. Gastroenterology 76, 1470—1482.
Moscatelli D., Sanui H., Rubin A. H. (1979). Effects of depletion of K^+, Na^+, or Ca^{2+} on DNA synthesis and cell cation content in chick embryo fibroblast. J. Cell. Physiol. 101, 117—128.
Otten J., Bader J., Johnson G. S., Pastan I. (1972). A mutation in a Rous sarcoma virus gene that controls adenosine 3', 5'-monophosphate levels and transformation. J. Biol. Chem. 247, 1632—1633.
Pool T. B., Smith N. K. R., Doyle K. H., Cameron I. L. (1980). Evaluation of a preparative method for x-ray microanalysis of soft tissue. Cytobios 28, 17—33.
Proll M. A., Pool T. B., Smith N. K. R. (1979). Quantitative decreases in the intracellular concentrations of sodium and other elements as BALB/c 3T3 fibroblasts reach confluence. J. Cell. Viol. 83, 13a.
Rozengurt R. (1979). Early events in growth stimulation. In «Surfaces of Normal and Malignant Cells» (R. O. Hynes, ed.). pp. 323—353. Wiley, New York.
Rozengurt E., Mendoza S. (1980). Monovalent ion fluxes and the control of cell proliferation cultured fibroblasts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 339, 175—190.

Rubin A. H., Teraski M., Sanui H. (1979). Major interacellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76, 3917—3921.
Rubin H. (1977). Specificity of the requirements for magnesium and calcium in the growth and metabolism fo chick embryo fibroblasts. J. Cell. Physiol. 91, 449—458.
Salako L. A., Smith A. J. (1970). Changes in sodium pool and kinetics of sodium transport in frog skin produced by amiloride. Br. J. Pharmacol. 39, 99—109.
Shen S. S., Hamamoto S. T., Bern H. A., Steinhardt R. A. (1978). Alteration of sodium transport in mouse mammary epithelium associated with neoplastic transformation. Cancer Res. 38, 1356—1361.
Siebert G. (1972). The biochemical environment of the mammalian nucleus. Subcell. Biochem. 1, 277—292.
Smith N. R., Sparks R. L., Pool T, B., Cameron I. L. (1978). Differences in the intracellular concentration of elements in normal and cancerous liver cells as determined by x-ray microanalysis. Cancer Res. 38, 1952—1958.
Sparks R. L., Cameron I. L. (1980). The effect of amiloride on proliferation of normal and transformed cells. Anat. Rec. 196, 251a.
Stumpf W. E., Roth L. J. (1966). High resolution autoradiography with dry-mounted, freeze-dried frozen sections. J. Histochem. Cytochem. 14, 274—287.
Stumpf W. E., Roth L. J. (1969). Autoradiography using dry mounted freeze-dried sections. In «Autoradiography of Diffusible Substances» (L. J. Roth and W. E. Stumpf, eds.), pp. 69—80. Academic Press, New York.
Toth B. (1975). Synthetic and naturally occurring hydrazines as possible cancer causative agents. Cancer Res. 35, 3693—3697.
Trumpf B. F., Berezesky I. K., Chang S. H., Pendergrass R. E., Mergner W. J. (1979). The role of ion shifts in cell injury. Scanning Electron Microsc. 3, 1—14.
Whitfield J. F., Boynton A. L., McManus J. P., Sikorska M., Tsang B. K. (1979). The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol. Cell. Biochem. 27, 155—179.
Whitfield J. F., Boynton A. L., McManus J. P., Rixon R. H., Sikorska M., Tsang B., Walker P. R., Swierenga S. H. H. (1980). The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. N. Y. Acad. Sci 339, 216—239.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к русскому изданию 5

Предисловие 6

1. Трансформированная клетка: некоторые вводные замечания . . . 7
Иван Л. Камерон и Томас Б. Пул
(Ivan L. Kameron and Thomas B. Pool)

2. Злокачественная трансфрмация: корреляции методов in vivo и in vitro 12
Филип Скехан и Сюзен Дж. Фридман
(Philip Skehan and Susan J. Friedman)

3. Малигнизация и клеточная поверхность 71
Сюзен Дж. Фридман и Филип Скехан
(Susan J. Friedman and Philip Skehan)

4. Регуляция клеточного цикла в нормальных и трансформированных клетках 134
Брюс Е. Магун и Юджин У. Гернер
(Bruce E. Magun and Eugene W. Gerner)

5. Фенотипическая экспрессия злокачественной трансформации и ее связь с энергетическим обменом 158
Чарлз Е. Уэннер и Л. Дэвид Томеи
(Charles E. Wenner and L. David Tomei)

6. Вирус-индуцированная трансформация 176
Мэри Пэт Мойер и Рекс С. Мойер
(Mary Pat Moyer and Rex C. Moyer)

7. Участие циклических нуклеотидов в трансформации 221
Кедар Н. Прасад
(Kedar N. Prasad)

8. Роль полиаминов в регуляции клеточного цикла нормальных и трансформированных клеток млекопитающих 250
Прасад С. Сункара и Поту Н. Рао
(Prasad S. Sunkara and Potu N. Rao)

9. Особенности нормальных, предопухолевых и опухолевых клеток и тканей молочной железы мышей, обнаруженные с помощью метода ядерного магнитного резонанса 270
Паула Т. Билл, Бонни Б. Эш, Даниел Медина и Карлтон Хэзлвуд
(Paula T. Beall, Bonnie B. Asch, Daniel Medina, Carlton Hazlewood)

10. Исследование микровязкости цитоплазмы клеток млекопитающих . 301
Андреа М. Мастро и Алек К. Кейт
(Andrea M. Mastro and Alec D. Keith)

11. Внутриклеточное pH и контроль роста в клетках эукариотов . . . 317
Роберт Дж. Джиллиз
(Robert J. Gillies)

12. Внутриклеточный натрий и регуляция роста. Сравнение нормальных и трансформированных клеток 362
Томас Б. Пул, Иван Л. Камерон, Нэнси К. Р. Смит и Родни Л. Спаркс
(Thomas B. Pool, Ivan L. Cameron, Nancy K. R. Smith, Rodney L. Sparks)